



Mílton Jorge Santos Cordeiro

Licenciado em Biologia Celular e Molecular

**Desenvolvimento de *Primer* universal de SBE
para Codificação Espectral de SNP**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Letícia Giestas,
Post-Doc, FCT/UNL

Co-orientador: Doutor Pedro Viana Baptista,
Professor Auxiliar com Agregação, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro

Arguente: Doutora Carla Alexandra Moreira Portugal

Vogal: Letícia da Conceição Batista Giestas



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2012



Mílton Jorge Santos Cordeiro

Licenciado em Biologia Celular e Molecular

**Desenvolvimento de *Primer* universal de SBE
para Codificação Espectral de SNP**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Letícia Giestas,
Post-Doc, FCT/UNL

Co-orientador: Doutor Pedro Viana Baptista,
Professor Auxiliar com Agregação, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro

Arguente: Doutora Carla Alexandra Moreira Portugal

Vogal: Doutora Letícia da Conceição Batista Giestas



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2012

Título: ‘Desenvolvimento de *Primer* universal de SBE para Codificação Espectral de SNPs’

Copyright em nome de Milton Jorge Santos Cordeiro, e da FCT/UNL.

‘A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.’

Agradecimentos

Aos meus pais, José António e Eugénia, pelo o apoio incondicional que sempre demonstraram.

Ao meu irmão, Bruno, por todos os conselhos e bons momentos.

Ao professor Pedro Baptista, pela oportunidade, confiança e orientação.

À Doutora Letícia, pela orientação, pela sua sinceridade e acima de tudo, pela sua paciência.

A todos os membros do grupo, nomeadamente, Rosa, Fábio, Veigas, Larguinho, Ana e Conde por todos os conselhos e pelo óptimo espírito de equipa que sempre demonstraram.

À Rita, por estes anos de apoio, ajuda e compreensão.

Aos meus amigos Pedro Peres (Pekas), Carlos Damas (Bana), André Marques, José Azevedo (Kebra) e Luis Costa (Lois), por estes anos todos de amizade e momentos de lazer.

Resumo

Na presente dissertação é apresentado o desenvolvimento de um *primer* universal para codificação espectral de SNP. A utilização deste *primer* universal permite que o mesmo oligonucleótido marcado com um doador (D_1) possa ser utilizado na análise de múltiplos SNPs de forma universal.

Para o desenvolvimento deste *primer* universal foi necessário verificar se o doador utilizado e os aceitantes (que marcam os ddNTPs) permitiam a obtenção de sinais de FRET que identificassem o par doador/aceitante formado (e com isso a confirmação da reacção de extensão de uma só base (SBE)). Para tal utilizou-se D_1 como *primer* de SBE e verificou-se que este sistema permitiu a identificação do par doador/aceitante, em reacções que continham 1 ddNTP e 2 ddNTPs. Não foi possível, no entanto, discriminar a incorporação de 1 ddNTP aquando da presença dos 4 ddNTPs.

No seguimento, desenvolveu-se o *primer* universal para codificação espectral. Nesta abordagem, é utilizado um *primer* que contém, simultaneamente, a sequência complementar à sequência adjacente ao SNP que se pretende detectar e a sequência complementar a D_1 . Desta forma, após uma reacção de extensão de uma só base, a hibridação entre D_1 e o *primer* universal leva à aproximação entre o doador e o aceitante incorporado, permitindo que ocorra transferência de energia entre ambos. A análise espectral dos produtos de reacção permitiu a identificação do ddNTP incorporado no *primer* universal, e desta forma, a identificação do nucleótido que ocupa a posição a ser analisada. Foram avaliadas as respostas deste sistema para as seguintes condições: 1 *template* e 1 ddNTP, 1 *template* e 2 ddNTPs, 2 *templates* e 2 ddNTPs, 1 *template* e 4 ddNTPs. Foi possível detectar o par doador/aceitante nas reacções que continham 1 ddNTP e 1 *template*. Foi também identificado o par doador/aceitante nas situações que mimetizam genótipos homozigótos (1 *template* e dois ddNTPs) e genótipos heterozigótos (2 *templates* e 2 ddNTPs). No entanto, não foi possível a identificação do par doador/aceitante nas reacções que continham os 4 ddNTPs.

Este sistema foi aplicado em 6 amostras biológicas contendo um SNP que está envolvido na predisposição ao desenvolvimento de obesidade, cujo genótipo foi confirmado por sequenciação. Das 6 amostras testadas, o sistema desenvolvido identificou correctamente 4 genótipos.

Apesar de necessitar de uma optimização mais extensa, o sistema de *primer* universal desenvolvido durante esta dissertação permite a identificação de diferentes SNPs, utilizando o mesmo oligonucleótido marcado com o doador.

Termos Chave: SNP, SBE, FRET, *Primer* Universal, Codificação Espectral.

Abstract

In the present dissertation it is presented the development of a universal primer for spectral codification of SNP. This primer allows the use of the same donor labeled oligonucleotide (D_1), for the analysis of multiple SNP.

For the development of this universal primer, it was necessary to verify if the used donor molecule and acceptors molecules (these acceptor are labeling the ddNTPs), can be use to produce unequivocal spectral signatures that identify the presence of a given donor/acceptor pair (and with this, the confirmation of the success of the SBE reaction). To evaluate this, D_1 was used as a SBE primer and it was verified that, this system allowed the identification of the donor/acceptor pair in reaction with 1 ddNTP and 2 ddNTPs. However, it was not possible to identify the donor/acceptor, and therefor, the discrimination of the incorporation of 1 ddNTP, when in solution the 4 ddNTPs where present.

Then, the universal primer was developed. This system combines the sequence specific SBE primer (that is complementary to the sequence adjacent to the SNP to be analysed) with the complementary sequence of D_1 . Therefore, after a template dependent single base extension (using acceptor labelled ddNTP), the hybridization of D_1 to its complementary sequence on the universal SBE primer brings the donor and the acceptor into close proximity, allowing FRET to occur between the two. A spectral analysis results in the identification of the donor/acceptor pair formed in solution, and therefore, the SNP being assessed.

The specific FRET signatures were evaluated for the following conditions: 1 template and 1 ddNTP, 1 template and 2 ddNTPs, 2 templates e 2 ddNTPs, 1 template e 4 ddNTPs. It was possible to identify the donor/acceptor pair formed in the reactions with 1 ddNTP and 1 template. It was also possible to identify the donor/acceptor pair formed in the reactions that mimics a homozygote genotype (1 template and 2 ddNTPs) and a heterozygote genotype (2 templates and 2 ddNTPs). However, it was not possible to identify the donor/acceptor pairs formed in reaction with one template and the 4 ddNTPs.

This system was applied in 6 biological samples that contained a SNP involved in the predisposition for obesity. The genotypes of these biological samples were confirmed by DNA sequencing. Of the 6 tested samples, this system was able to correctly identify 4 genotypes.

The presented system still requires an extensive optimization, but with it, the use of the same donor labeled oligonucleotide for the detection of different SNP was possible.

Key Words: SNP, SBE, FRET, Universal primer, Spectral Codification.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XV
1.INTRODUÇÃO	1
1.1. TECNOLOGIAS DE GENOTIPAGEM DE SNP	3
1.1.1. <i>Clivagem enzimática</i>	4
1.1.2. <i>Hibridação</i>	4
1.1.3. <i>Hibridação seguida de passo enzimático</i>	5
1.1.3.1. <i>Reacção de extensão de uma só base</i>	6
1.2. FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER	8
1.3. MODELO BIOMOLECULAR UTILIZADO	11
1.3.1. <i>C-MYC</i>	11
1.3.2. <i>FTO</i>	12
2. OBJECTIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. MATERIAIS	17
3.1.1. <i>Reagentes</i>	17
3.1.2. <i>Equipamentos</i>	19
3.2. MÉTODOS	19
3.2.1. <i>Condições de espectrofluorimetria</i>	19
3.2.2. <i>Espectros de emissão de ddNTPS e doadores isolados</i>	20
3.2.3. <i>SBE em templates sintéticos utilizando oligonucleótido marcado com doador (D₁) como primer de SBE</i>	20
3.2.4. <i>Reacções de SBE com primer universal em sequências de DNA sintético contendo uma porção do gene C-MYC</i>	22
3.2.5. <i>Reacções de SBE com primer universal em alvos correspondentes a produtos de PCR de C-MYC</i>	24
3.2.6. <i>Reacções de SBE com primer universal em produtos de PCR de FTO</i>	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. ESPECTROS ISOLADOS DE DOADOR E DE ACEITANTES	33
4.2. SBE EM <i>TEMPLATES</i> SINTÉTICOS UTILIZANDO D ₁ COMO <i>PRIMER</i> DE SBE	34

4.2.1. <i>Reacção com um template de DNA sintético e respectivo ddNTP</i>	34
4.2.2. <i>Reacção de SBE com dois templates de DNA sintético e dois ddNTP</i>	36
4.2.3. <i>Reacção de SBE com um template de DNA sintético e quatro ddNTP</i>	37
4.2.4. <i>Reacção de SBE com dois templates de DNA sintético e quatro ddNTP</i>	39
4.3. CONSTRUÇÃO DO <i>PRIMER</i> UNIVERSAL DE SBE PARA CODIFICAÇÃO ESPECTRAL	42
4.4. REACÇÕES DE SBE COM <i>PRIMER</i> UNIVERSAL EM SEQUÊNCIAS DE DNA SINTÉTICO CONTENDO UMA PORÇÃO DO GENE C-MYC	44
4.4.1. <i>Reacção de SBE com um template de DNA sintético e respectivo ddNTP</i>	44
4.4.2. <i>Reacção com template de DNA sintético na presença de dois ddNTP</i>	47
4.4.3. <i>Reacção de SBE com um template de DNA sintético e quatro ddNTP</i>	49
4.5 REACÇÕES DE SBE COM <i>PRIMER</i> UNIVERSAL EM ALVOS CORRESPONDENTES A PRODUTOS DE PCR DE C-MYC	51
4.5.1. <i>Perfil de desnaturação de reacção de SBE em produto de PCR do gene C-MYC na presença de ddATP</i>	51
4.5.2. <i>Hibridação ao longo do tempo de D_1 com primer universal após reacção de SBE na presença de ddA</i>	54
4.6. REACÇÕES DE SBE COM <i>PRIMER</i> UNIVERSAL EM PRODUTOS DE PCR DE FTO	55
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	59
6. BIBLIOGRAFIA	63
7. ANEXOS	73
ANEXO A – PLASMÍDEO UTILIZADO PARA CLONAR UMA PORÇÃO DO EXÃO 3 DE C-MYC, SEQUÊNCIA DE C-MYC UTILIZADA NOS ENSAIOS DE HIBRIDAÇÃO, SEQUÊNCIA DE PRODUTO DE PCR DO GENE FTO QUE CONTÉM O A SER DETECTADO	75
ANEXO B - FLUOROGRAMAS DE SEQUENCIAÇÃO	76
ANEXO C – PRODUTOS DE PCR UTILIZADOS COMO <i>TEMPLATES</i> NAS REACÇÕES DE SBE	80
ANEXO D – ESPECTROS DE EMISSÃO DAS REACÇÕES DE SBE	81

Índice de Figuras

Figura 1.1. Representação esquemática de transferência de energia de um doador no estado excitado (D^*) para um aceitante no estado fundamental (A) através de um processo não radiativo	8
Figura 1.2. Variação da eficiência de transferência de energia em função da distância que separa o doador do aceitante.....	9
Figura 1.3. Sobreposição entre espectro de emissão do doador e espectro de absorção do aceitante ...	9
Figura 4.1. Espectros de emissão do doador e diferentes aceitantes	33
Figura 4.2. Espectros de emissão das reacções de SBE, e reacção controlo, com <i>template</i> TLT na presença de ddA	35
Figura 4.3. Espectros de emissão da precipitação de reacção de SBE, e reacção controlo, com <i>template</i> TLT na presença de ddA	36
Figura 4.4. Espectros de emissão das reacções de SBE, e reacções controlo, com os <i>templates</i> TLC e TLT na presença de ddA e ddG	37
Figura 4.5. Espectros de emissão das reacção de SBE, e reacção controlo, com <i>template</i> TLT na presença dos 4 ddNTPs.....	38
Figura 4.6. Espectros de emissão da precipitação de reacção de SBE, e reacção controlo, com <i>template</i> TLT na presença dos 4 ddNTPs.....	39
Figura 4.7. Espectros de emissão das reacções de SBE, e reacções controlo, com os <i>templates</i> TLC e TLT na presença dos 4 ddNTPs	40
Figura 4.8. Espectros de emissão da precipitação de reacção de SBE, e reacção controlo, com <i>template</i> de TLT e TLC na presença dos 4 ddNTPs.....	41
Figura 4.9. Representação esquemática da reacção de SBE utilizando um <i>primer</i> universal.....	42
Figura 4.10. Espectros de emissão da reacção de SBE, e reacção controlo, utilizando o <i>primer</i> universal com <i>template</i> TLT na presença de ddA	44
Figura 4.11. Espectros de emissão da reacção de SBE, utilizando o <i>primer</i> universal na presença de TLT e ddA para o cálculo de eficiência de transferência de energia.....	46
Figura 4.12. Espectros de emissão da reacção de SBE, e reacção controlo, utilizando o <i>primer</i> universal com diferentes <i>templates</i> na presença de ddA e ddU	48
Figura 4.13. Espectros de emissão da reacção de SBE, e respectivo controlo, utilizando o <i>primer</i> universal com Univ-TLA e na presença de 4 ddNTPs	49
Figura 4.14. Espectros de emissão da precipitação da reacção de SBE e respectivo controlo, utilizando o <i>primer</i> universal com Univ-TLA na presença 4 ddNTPs	50
Figura 4.15. Perfil de desnaturação entre D_1 e o <i>primer</i> universal com ddA incorporado.....	51
Figura 4.16. Perfil de desnaturação dos diferentes controlos.....	53

Figura 4.17. Representação da área da banda de emissão de ddA em função do tempo, após adição de D ₁	54
Figura 4. 18. Espectros de emissão da reacção de SBE, e reacção controlo, utilizando o <i>primer</i> universal com produto de PCR da amostra 2.....	56
Figura 4.19. Representação esquemática dos resultados obtidos através da genótipagem do SNP rs9939609 nos produtos de PCR de amostras biológicas, utilizando o sistema de <i>primer</i> universal ...	57
Figura A.1. Plasmídeo pGFP utilizado para clonar sequência de C-MYC	75
Figura B.1. Fluorógrama de sequenciação da porção de C-MYC clonada em pGFP	76
Figura B.2. Fluorógrama de sequenciação de amostra 1	76
Figura B.3. Fluorógrama de sequenciação de amostra 2	77
Figura B.4. Fluorógrama de sequenciação de amostra 3	77
Figura B.5. Fluorógrama de sequenciação de amostra 4	78
Figura B.6. Fluorógrama de sequenciação de amostra 5	78
Figura B.7. Fluorógrama de sequenciação de amostra 6	79
Figura C.1. Electroforese em gel de agarose de produto de PCR de C-MYC após precipitação.....	80
Figura C.2. Electroforese em gel de agarose de produto de PCR de FTO	80
Figura C.3. Electroforese em gel de agarose de produto de PCR de FTO após extracção do gel de agarose.....	80
Figura D.1. Espectros de emissão das reacção de SBE, e reacção controlo, com <i>template</i> TLA na presença de ddU	81
Figura D.2. Espectros de emissão das reacção de SBE, e reacção controlo, com <i>template</i> TLG na presença de ddC	81
Figura D.3. Espectros de emissão das reacção de SBE, e reacção controlo, com <i>template</i> TLC na presença de ddG	82
Figura D.4. Espectros de emissão das reacção de SBE, e reacção controlo, com <i>template</i> TLC na presença de 4 ddNTPs	82
Figura D.5. Espectros de emissão da reacção de SBE, e respectivo controlo, utilizando o <i>primer</i> universal com <i>template</i> Univ-TLA e na presença de ddU	83
Figura D.6. Espectros de emissão da reacção de SBE, e respectivo controlo, utilizando o <i>primer</i> universal com <i>template</i> Univ-TLG na presença de ddC	83
Figura D.7. Espectros de emissão da reacção de SBE, e respectivo controlo, utilizando o <i>primer</i> universal com <i>template</i> Univ-TLC e na presença de ddG	84

Figura D.8. Espectros de emissão da reacção de SBE, e respectivo controlo, utilizando o <i>primer</i> universal com <i>template</i> Univ-TLC na presença de 4 ddNTPs	84
Figura D.9. Espectros de emissão da reacção de SBE e reacção controlo, utilizando o <i>primer</i> universal na presença de diferentes <i>templates</i> e ddA e ddU	85
Figura D.10. Espectros de emissão da reacção de SBE e reacção controlo, utilizando o <i>primer</i> universal na presença de diferentes <i>template</i> , ddA e ddU	86

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. Reagentes químicos utilizados	17
Tabela 3.2. Oligonucleótidos sintéticos alvo	18
Tabela 3.3. <i>Primers</i> universais de SBE	18
Tabela 3.4. <i>Primers</i> utilizados nas reacções de PCR.....	18
Tabela 3.5. Oligonucleótido revelador marcado com doador	18
Tabela 3.6. ddNTPs marcados com aceitantes	18
Tabela 3.7. Equipamento utilizado	19
Tabela 3.8. Parâmetros de medição dos espectros de emissão.....	19
Tabela 3.9. Programa de ciclos térmicos utilizado nas reacções de SBE em <i>templates</i> sintéticos.....	20
Tabela 3.10. Programa de ciclos térmicos utilizados para as reacções de SBE em <i>templates</i> sintéticos contendo uma porção de C-MYC.....	23
Tabela 3.11. Programa de ciclos térmicos utilizados para a hibridação de D ₁ com <i>primer</i> universal .	23
Tabela 3.12. Mistura reaccional utilizada para a obtenção de produtos de PCR de C-MYC.....	26
Tabela 3.13. Programa de ciclos térmicos utilizado para a obtenção de produtos de PCR de C-MYC	26
Tabela 3.14. Mistura reaccional para a obtenção de produtos de PCR do gene FTO.....	28
Tabela 3.15. Programa de ciclos térmicos utilizados para a obtenção de produtos de PCR de FTO ..	28
Tabela 3.16. Tabela de programa de ciclos térmicos utilizados para as reacções de SBE em produtos de PCR do gene FTO.....	29
Tabela 4.1. Sequências possíveis para <i>primer</i> universal.....	43
Tabela 4.2. Genótipo das amostras biológicas utilizadas como <i>templates</i> nas reacções de SBE	56

Lista de abreviaturas e símbolos

%GC	–	Porcentagem de guanina e citosina
ARMS	–	<i>Amplification Refractory Mutation System</i>
ASO	–	<i>Allele Specific Oligonucleotide</i>
C-MYC	–	<i>Human V-MYC myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
COP	–	<i>Competitive Oligonucleotide Priming</i>
D ₁	–	Oligonucleótido marcado com doador
ddA	–	DideoxiAdenosina trifosfato
ddC	–	DideoxiCitosina trifosfato
ddG	–	DideoxiGuanosina trifosfato
ddNTP	–	Dideoxinucleótidos
ddU	–	Dideoxiuridina trifosfato
dNTP	–	Desoxirribonucleótidos
F _D	–	Intensidade de Fluorescência do doador
F _{DA}	–	Intensidade de Fluorescência do doador na presença de aceitantes
FRET	–	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
FTO	–	<i>Fat mass obesity associated gene</i>
LB	–	Luria Bertani
NN T _m	–	Temperatura de <i>melting</i> segundo o modelo ‘ <i>Near Neighbor</i> ’
OLA	–	<i>Oligonucleotide Ligation Assay</i>
PCR	–	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGH	–	Projecto Genoma Humano
R	–	Distância entre doador e aceitante
R ₀	–	Distância de Förster
RFLP	–	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SBE	–	<i>Single Base Extension</i>
SNP	–	Polimorfismos de uma base
Tag	–	Sequência de reconhecimento
T _m	–	Temperatura de <i>melting</i>
u.a	–	Unidades arbitrárias
UV	–	Ultra Violeta
VNTR	–	Sequências repetidas em <i>tadem</i>
λ_{exc}	–	Comprimento de onda de excitação
ϕ_{et}	–	Eficiência de transferência de energia

O trabalho realizado e apresentado nesta tese foi escolhido para apresentação oral nas XXXVII Jornadas Portuguesas de Genética, Maio de 2012 - Lisboa.

Optimisation of Spectral Codification coupled to SBE for genotyping

M. Cordeiro¹, P. Baptista¹, L. Giestas¹

¹ CIGMH/DCV, Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa, Campus da Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal, Tel/Fax: +351 212 948 530;
Presenting author's e-mail: m.cordeiro001@gmail.com

We have previously reported on a strategy that combines Förster Resonance Energy Transfer (FRET) based spectral codification with a single base extension (SBE) reaction for single nucleotide sequence discrimination in solution [1]. As proof-of-concept, we showed that this strategy is capable of unequivocally scoring the allele variants present in solution. To extend the use of this tool to any locus of interest, it would be required the development of an universal approach capable of combining a sequence specific SBE primer to an universal sequence labelled and optimised for spectral codification. Here, we demonstrate the optimisation strategy based on a labelled universal oligonucleotide (donor), the sequence specific primer that allows for incorporation of the complementary modified ddNTP (acceptor). Upon primer extension, the universal donor oligonucleotide hybridises to the specific SBE primer, bringing donor and acceptor into close proximity allowing the FRET to occur between the two. Spectral analysis results in identification of the incorporated acceptor ddNTP, thus of the SNP being assessed. We demonstrate this new genotyping strategy on synthetic targets encompassing a fragment of the c-MYC proto-oncogene.

[1]- Giestas L., Lima J. C., Baptista P. V., 2011. Coupling single base extension to a spectral codification tool for increased throughput screening. *Journal of Biotechnology*. 154, 199-204.

1.Introdução

O Projecto Genoma Humano (PGH), concluído em 2001 e posteriormente refinado em 2004, teve um profundo impacto na investigação biomédica ^{1, 2} ao permitir uma melhor compreensão das funções biológicas codificadas no genoma, a natureza molecular de doenças hereditárias, como o cancro, assim como a descoberta de vários marcadores moleculares associados à predisposição a doenças complexas, como a diabetes e o cancro ^{1, 3}.

Verificou-se que existe um grande número de pequenas variações entre genomas de diferentes indivíduos, nomeadamente, duplicações, deleções, translocações, inversões, sequências repetidas em *tandem* (VNTR) e polimorfismos de uma única base (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) ⁴. Os SNP são considerados as variações genéticas mais comuns ⁵ (ocorrendo com uma frequência média de 1 por cada 1000 pares de bases ⁶). Um SNP corresponde a uma variação de um único nucleótido, que ocupa um *locus* específico, e que se encontra representada em pelo menos 1% da população ⁷. Os SNP podem ser utilizados como marcadores moleculares para identificação de genes polimórficos que predis põem os portadores a doenças multifactoriais, como cancro ⁸, ou à capacidade de metabolização de fármacos ⁹. Isto porque, quando os SNPs se localizam em regiões codificantes, podem alterar a função ou a estrutura da proteína codificada, mas quando se localizam em regiões não codificantes (ex. em junções intrão-exão, promotores, ou sequências regulatórias como *enhancers*) podem alterar os níveis de expressão génica por alteração da estabilidade do mRNA, ou pela alteração dos padrões de *splicing* ^{10, 11}.

Conjuntos de SNPs também podem ser utilizados para a determinação de haplótipos, isto é, a combinação de alelos localizados no mesmo cromossoma que se pode encontrar numa dada população. Considerando que a probabilidade de recombinação entre dois *loci* é proporcional à distância entre eles, dois alelos que se encontrem próximos terão maior probabilidade de ser transmitidos à descendência em conjunto – *linkage disequilibrium* ^{12, 13}. Desta forma, um determinado conjunto de SNPs pode indicar a natureza dos alelos nas suas imediações, indicando por isso se o portador de determinado SNP terá a predisposição a determinado fenótipo ^{5, 12, 14}. Neste contexto, o desenvolvimento de tecnologias que permitam a genotipagem de SNP têm sido alvo de intensa investigação, de forma a ser possível o desenvolvimento de sistemas complementares de diagnóstico fiáveis, precisos e com vista à diminuição dos custos por ensaio.

1.1. Tecnologias de genotipagem de SNP

Uma grande variedade de métodos para a genotipagem de SNP tem sido desenvolvida ao longo dos últimos anos. As tecnologias de genotipagem de SNP têm, normalmente, duas componentes: uma das componentes é responsável pela determinação da base que ocupa a posição polimórfica em ambos os alelos (discriminação alélica) e um método para reportar a presença de determinado alelo (ou alelos) numa dada amostra de ácidos nucleicos ¹⁵. Existem três princípios de discriminação alélica: por clivagem enzimática, hibridação ou hibridação seguida de passo enzimático ^{16 17}.

1.1.1. Clivagem enzimática

A utilização de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi demonstrada pela primeira vez por Botstein *et al.* em 1980¹⁸ na aplicação a estudos de *linkage* em humanos. Nesta técnica são utilizadas enzimas de restrição que têm a capacidade de reconhecer e hidrolisar sequências específicas de DNA, e desta forma gerar fragmentos com tamanhos definidos^{19, 20}. Assim, a presença de um determinado SNP nas sequências de reconhecimento pode impedir a actuação das enzimas de restrição. Consequentemente a presença ou ausência de determinado SNP nos diferentes alelos pode ser detectada através dos diferentes padrões electroforéticos gerados. Este método tem a desvantagem de ser dependente das sequências de restrição e desta forma das enzimas de restrição disponíveis²¹.

Posteriormente, Lyamichev *et al.* desenvolveram o método designado por *Invader assay*²². Nesta abordagem, a utilização de uma 5'-exonuclease (FLAP endonuclease²³) permite a clivagem de um complexo tridimensional. Aqui são utilizados dois oligonucleótidos: um deles é totalmente complementar à sequência adjacente (em 5') e ao nucleótido a ser avaliado; o outro oligonucleótido é complementar à sequência a 3' da posição a ser avaliada. Este segundo oligonucleótido é modificado em 5' com um fluoróforo e internamente com um supressor de fluorescência (*quencher*). Quando ambos oligonucleótidos hibridam com a sequência alvo é formada uma estrutura tridimensional que pode ser clivada, se o segundo oligonucleótido contiver uma base complementar à posição polimórfica²⁴. Com a clivagem de parte da secção do oligonucleótido duplamente modificado, o fluoróforo é separado do *quencher* permitindo a detecção do nucleótido que ocupa a posição analisada, através da emissão de fluorescência por parte do fluoróforo. Esta metodologia foi refinada por Hall *et al.*²⁵ através da combinação de duas reacções de clivagem num único ensaio homogéneo (SISAR - *Serial Invasive Signal Amplification Reaction*). No entanto, estas técnicas (*Invader assay* e SISAR) têm a desvantagem de um dos oligonucleótidos necessitar de dupla marcação, elevando os custos por genotipagem de SNP²⁶.

1.1.2. Hibridação

Os métodos de discriminação alélica baseados em hibridação dependem da eficiência de hibridação entre duas cadeias simples complementares e na estabilidade da cadeia dupla formada²⁷. Em condições optimizadas, o emparelhamento incorrecto de uma base (*mismatch*) é suficiente para destabilizar a hibridação¹⁵. Geralmente, a capacidade de discriminação de sistemas baseados em hibridação é dependente da estabilidade térmica da dupla cadeia formada e das condições de estringência utilizadas²⁸ e estas dependem do desenho da sonda (ex. tamanho), da localização da base polimórfica na sonda e das condições de hibridação^{21, 29-31}.

A metodologia mais simples para a discriminação de alelos em posições polimórficas é a utilização de sondas de hibridação específicas para cada alelo (ASO – *Allele Specific oligonucleotides*). Neste caso, o desenho da sonda e/ou condições de estringência elevada são

suficientes para que um único *mismatch* previna a hibridação da sonda não complementar^{32, 17}. Os *Microarrays* desenvolvidos pela empresa Affimetrix, também são baseados nestes princípios³³. Estes sistemas permitem a genotipagem de uma extensa quantidade de SNPs por chip, cerca de 900 000³⁴, mas têm a desvantagem de terem elevados custos associados⁸.

1.1.3. Hibridação seguida de passo enzimático

Dos métodos de discriminação alélica baseados em hibridação com posterior passo enzimático, a metodologia mais simples denomina-se por hibridação competitiva de *primers* (COP – *Competitive oligonucleotide Priming*). Esta metodologia foi desenvolvida por Gibbs *et al.*³⁵ e envolve a utilização de dois conjuntos de *primer*. Um deles é totalmente complementar ao *template* da reacção e o outro conjunto é formado por vários *primers* que diferem nos nucleótidos na posição avaliada (normalmente, a meio do *primer*). Desta forma, em condições de estringência elevada, a hibridação do *primer* 100 % complementar é favorecida. Através da marcação diferencial dos diferentes *primers* (por exemplo, diferentes fluoróforos para diferentes *primers*) é possível determinar qual deles é incorporado no produto de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) formado. Este sistema tem a desvantagem de necessitar de uma extensa optimização, para cada SNP a detectar, de forma a garantir as condições óptimas de PCR. Só desta forma é possível minimizar a extensão de *primers* com *mismatches*³⁶.

Uma abordagem que permite maior sensibilidade é apresentada no sistema ARMS (*Amplification refractory mutation system*), desenvolvido por Newton *et al.*³⁷. Neste caso, um dos oligonucleótidos iniciadores (*primers*) da reacção é desenhado de forma a que o nucleótido presente na extremidade 3' se sobreponha ao resíduo polimórfico. Se esta sobreposição resultar num emparelhamento incorrecto (*mismatch*), a eficiência de amplificação é reduzida.

A técnica de ligação de oligonucleótidos (OLA – *Oligonucleotide Ligation Assay*) foi desenvolvida por Landegren *et al.*³⁸. Esta permite a detecção de bases polimórficas utilizando dois oligonucleótidos que hibridam lado a lado (extremidade 3' de um oligonucleótido ao lado da extremidade 5' do outro oligonucleótido), num alvo complementar de DNA. Tal como em ARMs, a discriminação da posição polimórfica é feita pela sobreposição da extremidade 3' de um dos oligonucleótidos, uma vez que as Ligases comumente utilizadas nestes ensaios (T4 DNA ligase e Tth DNA ligase) apresentam maior poder discriminatório em *mismatches* presentes nas bases em 3'³⁹. Se estes oligonucleótidos forem totalmente complementares ao *template*, a ligase promove a transesterificação entre os dois oligonucleótido levando à formação de uma ligação fosfodiéster entre estes dois oligonucleótidos. Se a posição polimórfica não contiver o nucleótido complementar ao nucleótido 3'-OH, os dois oligonucleótidos mantêm-se separados^{40, 41}. A utilização de oligonucleótidos de diferentes tamanhos e diferencialmente marcados permitem a utilização deste sistema em *multiplex*⁴². Esta técnica tem a vantagem de ser rápida e compatível com PCR (PCR-

OLA⁴³), tornando-a apropriada para genotipagem em grande escala ⁴⁴. No entanto, para a aplicação de genotipagem em grande escala, são necessárias várias sondas com marcação e/ou passos de separação dos produtos de reacção ⁸.

Dentro das reacções de hibridação seguidas de um passo enzimático, encontra-se a técnica de extensão de uma só base (SBE – *Single Base Extension*). Sendo a técnica escolhida para a realização dos trabalhos que suportam esta dissertação ser-lhe-á dado especial destaque na secção seguinte.

1.1.3.1. Reacção de extensão de uma só base

A SBE (ou ‘mini-sequenciação’) é uma técnica robusta que permite a genotipagem directa de um determinado *locus*. As reacções de SBE foram descritas pela primeira vez por Syvänen *et al.* ⁴⁵ em 1990, na genotipagem do gene codificante da apolipoproteína E. Estas reacções são baseadas na utilização de um oligonucleótido iniciador (*primer*) complementar à sequência adjacente (em 5’) da posição que se pretende analisar. Após a hibridação deste *primer*, DNA polimerases com a capacidade de utilizar dideoxynucleótidos (ddNTP), catalisam a incorporação do ddNTP complementar ao nucleótido que se pretende analisar que, por não possuir o grupo OH na posição 3’, impede a transesterificação de novo desoxiribonucleótido (dNTP) ou ddNTP ^{10, 46}. As DNA polimerases não deverão apresentar actividade exonucleolítica 3’-5’ (*proof-reading*), para evitar a degradação do *primer* ⁴⁷. No entanto, a utilização de análogos de DNA, como por exemplo, LNA (*Locked Nucleic Acid*) permitem a utilização de enzimas com *proof-reading*, aumentando a especificidade da reacção ⁴⁸. Os ddNTPs podem ser utilizados como substratos pela DNA polimerase do bacteriófago T7, pelo fragmento Klenow da DNA polimerase de *E.coli*, no entanto, a utilização de variantes geneticamente modificadas destas DNA polimerases aumenta a eficiência e a especificidade das reacções de SBE ^{49, 50}.

Como referido os ddNTP são análogos a dNTPs que não contêm o grupo hidroxilo na extremidade 3’ (carbono 3 da pentose). Desta forma, funcionam como terminadores da polimerização, impedindo a adição de novo nucleótido em 3’ ⁵¹. A utilização de ddNTPs marcados é preferível em relação à utilização de dNTPs, considerando que a incorporação de ddNTPs termina a extensão da cadeia e, desta forma, impossibilita a incorporação de dois, ou mais, dNTPs diferentes (marcados com diferentes grupos repórter) permitindo uma genotipagem precisa e mais sensível ⁵². Estes ddNTPs podem ser modificados com fluoróforos (com emissões distintas para cada nucleótido) ^{53–55}, ou com etiquetas de massa (*mass tags*) ^{56, 57}, consoante o método de detecção utilizado na identificação do ddNTP incorporado. A marcação com *mass tags* tem como objectivo alterar, de forma significativa, a massa molecular dos ddNTPs. Assim, é possível a identificação do ddNTP incorporado através de espectrometria de massa ^{56, 57}.

No caso de os ddNTPs serem modificados com fluoróforos, a identificação do nucleótido que ocupa a posição polimórfica é realizada através da identificação da emissão de fluorescência do

fluoróforo incorporado no *primer* de SBE. Nesta abordagem, a detecção do ddNTP incorporado pode ser realizada em meio homogéneo ou em meio heterogéneo.

A detecção em meio homogéneo pode ser realizada através do método de polarização de fluorescência ⁵⁸ ou através do fenómeno de FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) ^{53, 54}, que será detalhadamente descrito na secção seguinte. A utilização de FRET como modo de discriminação do ddNTP incorporado no *primer* de SBE requer que este seja marcado com um fluoróforo doador e que o ddNTP seja marcado com um fluoróforo aceitante. Desta forma, cada *primer* marcado com um doador é específico e só poderá ser utilizado para a discriminação de um SNP, elevando por isso o custo da genotipagem. A detecção em meio homogéneo tem a vantagem de não requerer a separação dos produtos da reacção de SBE, minimizando por isso, os passos necessários até à obtenção dos resultados de genotipagem.

A detecção em meio heterogéneo pressupõe a utilização de superfícies de forma a permitir a separação dos produtos de SBE dos restantes componentes de reacção. Nestas abordagens, o *primer* de SBE contém, normalmente, uma sequência específica de reconhecimento (na extremidade 5') (*Tag*). Após a reacção de SBE, a hibridação desta *Tag* com oligonucleótidos funcionalizados numa determinada superfície permite a imobilização dos produtos de SBE e desta forma a separação dos restantes componentes da reacção. Este é o princípio de funcionamento de *microarrays* desenvolvidos, para a discriminação de SNP, utilizando reacções de SBE ⁵⁹. Esta abordagem permite que vários SNP sejam detectados num mesmo *chip* uma vez que, após a reacção de SBE, os diferentes *primers* são separados dos restantes componentes da reacção pela hibridação das *Tags* com os respectivos oligonucleótidos funcionalizados na superfície sólida ^{60, 55}.

A utilização de reacções de SBE na genotipagem da SNP torna-se vantajosa, em relação a métodos baseados apenas em hibridação (como por exemplo, as sondas ASO). Isto porque, a distinção entre variantes alélicas é mediada por um passo enzimático, que tende a ser altamente específico (depende da polimerase utilizada). Desta forma, a discriminação entre alelos homozigóticos e heterozigóticos não é dependente da ligeira diferença de estabilidades entre sondas totalmente complementares e sondas com *mismatches*, que podem sofrer grandes discrepâncias consoante as condições de estringência utilizadas ⁶¹. Esta técnica de genotipagem apenas requer a utilização de um *primer* (marcado ou não), ao contrário das abordagens como COP, ARMs ou ASO. Considerando que o *primer* utilizado nas reacções de SBE, não necessita de se sobrepor à base a ser identificada (como nas técnicas anteriormente referidas), o mesmo *primer* pode ser utilizado para casos de homo- e heterozigotia. As reacções de SBE apresentam uma capacidade de discriminação entre homo- e heterozigóticos superior a sondas ASO, em uma ordem de grandeza ⁶².

1.2. Förster Resonance Energy Transfer

FRET – Förster *Resonance Energy Transfer* - é um processo físico de transferência de energia não radiativo entre uma molécula – o doador - electronicamente excitada para uma outra molécula - o aceitante - que se encontra no estado fundamental. A transferência de energia por ressonância foi matematicamente descrita por Theodore Förster, em 1948 ⁶³. Esta transferência ocorre através de interações dipolo-dipolo entre os diferentes estados electrónicos do doador e do aceitante, não envolvendo a emissão e a reabsorção de fotões. O diagrama de Jablonski na Figura 1.1 representa, de forma simplificada, o processo de FRET.

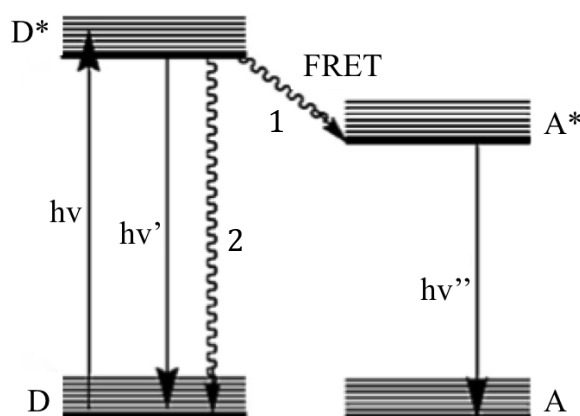


Figura 1.1. Representação esquemática de transferência de energia de um doador no estado excitado (D^*) para um aceitante no estado fundamental (A) através de um processo não radiativo

Após transferência de energia o aceitante passa ao estado excitado (A^*), seguindo-se o seu decaimento para estado fundamental. $h\nu$ - comprimento de onda de excitação do doador; $h\nu'$ - Comprimento de onda de emissão do doador; $h\nu''$ - comprimento de onda de emissão do aceitante.

As linhas contínuas representam os processos radiativos; as linhas onduladas representam os processos não radiativos. Adaptado de 'Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: Principle and applications' ⁶⁴.

Para a compreensão do processo de FRET é necessário considerar quatro estados electrónicos: Os estados fundamentais e os estados excitados do doador e do aceitante (D , D^* e A , A^* , representados na Figura 1.1). Considerando o caso em que ambas as moléculas se encontrem no estado fundamental (D e A): a absorção de energia por parte do doador (fotões com comprimentos de onda adequados- $h\nu$ na Figura 1.1) promove o doador para o estado excitado (D^*). No caso de não existir um aceitante adequado na proximidade do doador, este pode retomar ao estado fundamental por emissão de fotões ($h\nu'$ na Figura 1.1) e por processos não radiativos (seta ondulada 2 na Figura 1.1). No caso de existir um aceitante adequado na sua proximidade, o doador pode transferir parte da sua energia de excitação (através do acoplamento dipolar – seta ondulada 1 na Figura 1.1) para o aceitante no estado fundamental, promovendo-o para o estado excitado. O aceitante pode retornar ao estado fundamental através da emissão de fotões ($h\nu''$ - Figura 1.1), no caso de o aceitante ser um fluoróforo ⁶⁴⁻⁶⁶.

A eficiência de transferência de energia (Φ_{Et}) é inversamente proporcional à sexta potência da distância (R) entre o doador e o aceitante e é dependente da distância de Förster (R_0) que é definida como a distância à qual Φ_{Et} é de 50% - expressão 1⁶⁵.

$$\Phi_{Et} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (\text{expressão 1})$$

Esta expressão mostra que a Φ_{Et} é dependente do inverso da sexta potência da distância (R) que separa o doador do aceitante quando esta se aproxima de R_0 , como se pode observar na Figura 1.2.

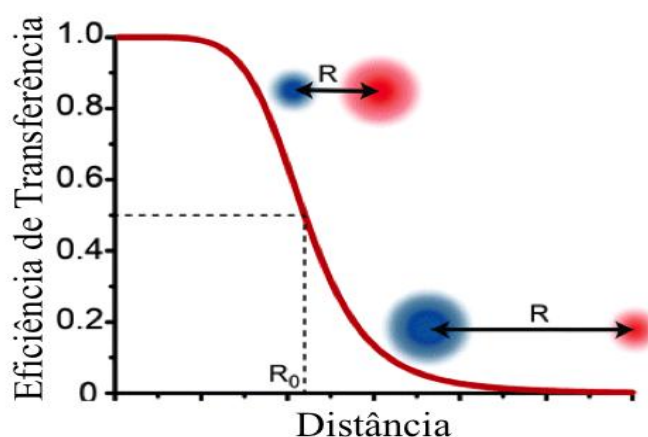


Figura 1.2. Variação da eficiência de transferência de energia em função da distância que separa o doador do aceitante

A esfera a azul representa a emissão do doador; a esfera a vermelho representa a emissão do aceitante

R_0 é proporcional ao integral de sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do aceitante, sendo característica do par doador/aceitante utilizado – Figura 1.3.

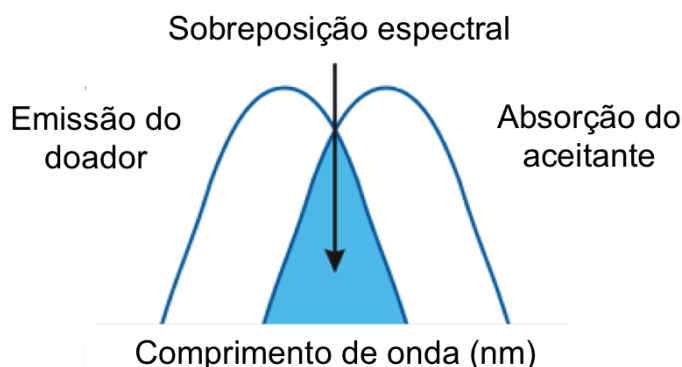


Figura 1.3. Sobreposição entre espectro de emissão do doador e espectro de absorção do aceitante

Adaptado de <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer-FRET.html>

R_0 (e como tal a Φ_{Et}), para além de ser dependente do integral de sobreposição do espectral, também é dependente da orientação espacial do momento dipolar de emissão do doador em relação ao momento dipolar de absorção do aceitante. Se os vectores destes momentos forem perpendiculares, a eficiência de transferência é nula, se forem coplanares a eficiência de transferência é máxima, caso as restantes variáveis mencionadas anteriormente e distância o permitirem ⁶⁴⁻⁶⁶.

A Φ_{Et} , pode ser inferida através da comparação entre a emissão de fluorescência do doador na ausência do aceitante (F_D) e na presença do aceitante (F_{DA}), no caso de as medidas serem realizadas em estado estacionário – expressão 2 ⁶⁵, ou pela comparação dos tempos de decaimento nestas mesmas condições (τ_D e τ_{DA}), quando as medidas são realizadas por medidas resolvidas no tempo – expressão 3 ⁶⁵.

$$\Phi_{Et} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (\text{expressão 2})$$

$$\Phi_{Et} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (\text{expressão 3})$$

Em termos práticos, quando a distância entre o doador e o aceitante é muito superior a R_0 , a transferência de energia entre doador e aceitante não ocorre. À medida que esta distância se aproxima de R_0 , a Φ_{Et} aumenta abruptamente – Figura 1.2. O intervalo de distâncias à qual ocorre FRET, está compreendido entre os 10 e os 100 Ångström (Å). Tendo em conta o intervalo de distâncias à qual ocorre FRET e que Φ_{Et} tem uma forte dependência na distância que separa o doador do aceitante, este fenómeno tem sido amplamente aplicado no estudo de interacções de biomoléculas. Existem descritos na literatura vários exemplos da aplicação deste fenómeno, nomeadamente no estudo do *folding* de proteínas ⁶⁷, interacções proteína-proteína ⁶⁸, localização intracelular de proteínas ⁶⁹, estudo de estruturas de DNA *in vivo* ⁷⁰ e *in vitro* ⁷¹, entre outros ⁷²⁻⁷⁴.

A aplicação de FRET em tecnologias de genotipagem de SNP, como reacções de SBE, pode ser realizada através da utilização de um *primer* marcado com um doador e através de ddNTPs marcados com diferentes aceitantes, que emitam comprimentos de onda diferentes (bandas de emissão distintas para os 4 ddNTPs). Desta forma, após uma reacção SBE, o ddNTP complementar (marcado com o aceitante) ao que se encontra na posição avaliada é incorporado no *primer*, levando à aproximação do doador e do aceitante, permitindo que FRET ocorra entre ambos. Desta forma, a identificação do nucleótido que se encontra na posição avaliada é possível através do aumento na intensidade de emissão de fluorescência do aceitante ligado ao ddNTP incorporado.

O número de SNP analisáveis na mesma reacção depende do número de diferentes *primers* marcados com diferentes doadores. No entanto, a utilização de múltiplos doadores na mesma reacção pode resultar em sinais de FRET dúbios, uma vez que a distinção dos sinais obtidos aquando da

excitação directa do doador 1 pode não ser claramente distinguível dos sinais obtidos aquando da excitação directa do doador 2 ⁷⁵. Ou seja, o sucesso desta abordagem depende da possibilidade de obtenção de sinais claros de FRET que permitam a identificação clara dos ddNTPs incorporados em cada *primer* (identificação dos pares doador/aceitante formados em solução). Esta identificação pode ser dificultada devido à excitação cruzada dos aceitantes, aquando da excitação directa de cada um dos doadores.

Giestas *et al.*, apresentaram um modelo matemático que permite a descodificação dos sinais de FRET obtidos ^{75, 76}. Esta metodologia de codificação espectral permite a distinção entre: dois *loci* homozigóticos; dois *loci* heterozigóticos; e um *locus* heterozigótico e um *locus* homozigótico. Nesta abordagem, os doadores são selectivamente excitados, isto é, cada um dos doadores é excitado ao seu máximo de absorção, e a resposta dos aceitantes permite determinar o par doador/aceitante formado. Para a realização da codificação espectral, é necessário obter os espectros de cada fluoróforo de forma a construir o espectro de emissão de uma amostra com determinada composição, através do ajuste ao espectro de emissão obtido experimentalmente para a mesma amostra. Os coeficientes resultantes deste ajuste podem ser comparados aos coeficientes teóricos gerados para as possíveis composições de amostra e, assim, identificar os pares doador/aceitante existentes na amostra em análise.

Estes coeficientes teóricos são dependentes dos coeficientes de extinção molar de cada fluoróforo, assim como da Φ_{Et} para cada par doador/aceitante ^{75, 76}.

Posteriormente, esta codificação espectral foi acoplada a reacções de SBE e foi demonstrado que esta também permite a identificação inequívoca e simultânea de dois *loci* homo- e/ou heterozigóticos ⁵³. Apesar da versatilidade deste método, este tipo de genotipagem (hibridação seguido de passo enzimático) requer tantos *primers* marcados com doadores consoante o número de SNPs que se pretendem detectar na mesma reacção, de forma a que cada doador codifique um SNP específico. Isto porque, cada *primer* marcado é composto por uma sequência específica que é complementar à sequência adjacente ao SNP que se pretende detectar. Desta forma, cada *primer* marcado só pode ser utilizado na análise de um único SNP. De forma a contornar este problema e diminuir os custos deste tipo de genotipagem, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de um *primer* universal para codificação espectral, que permita a utilização do mesmo *primer* marcado com doador para a análise de múltiplos SNPs.

1.3. Modelo biomolecular utilizado

1.3.1. C-MYC

O proto-oncogene C-MYC encontra-se localizado no cromossoma 8, e codifica um factor de transcrição com capacidade de remodelar a estrutura da cromatina ⁷⁷. Este factor de transcrição está em envolvido em múltiplos papéis celulares, como por exemplo, a regulação da proliferação celular,

diferenciação e apoptose, através da alteração da expressão de diversos genes ⁷⁸. A elevada expressão deste gene está envolvida em diversos tipos de cancro, como melanomas, carcinomas e leucemia ^{79–82}.

A escolha deste alvo prendeu-se principalmente com a sua relevância transversal na tumorigenese e, de um ponto de vista prático, com o facto de existirem inúmeros recursos biológicos no Grupo de Nanotheranostics@CIGMH, onde foi realizado o projecto ^{83, 84}. Deste modo, foi possível ter acesso directo a um *template* adequado para desenho do *primer* universal para codificação espectral em condições que maximize a eficiência da reacção de SBE.

1.3.2. FTO

A obesidade é um problema crescente de saúde a nível mundial que afecta pessoas de todas as idades, de ambos os géneros e dos diferentes grupos étnicos ⁸⁵. O desenvolvimento de obesidade está associado ao desenvolvimento de várias doenças como diabetes *mellitus* 2, doenças cardiovasculares, hipertensão e algumas formas de cancro ⁸⁶.

Estudos de associação de genomas (GWAS – *Genome Wide Association Studies*), realizados por Fralyn et al. ⁸⁷ demonstraram que o SNP rs9939609, no gene FTO (*Fat mass obesity associated gene*), estava associado a indivíduos com índices de massa corporal elevados. Estudos bioinformáticos de comparação de homologias, prevêem que este gene codifique demetilases de DNA/RNA ⁸⁸, existindo estudos bioquímicos que suportam essas previsões ⁸⁹, podendo este gene estar envolvido na regulação epigenética de genes envolvidos no desenvolvimento e manutenção de adipócitos ⁹⁰. Este SNP pode ser composto pelo alelo que contém uma timina (variante alélica T) ou pelo alelo que contém uma adenina (variante alélica A), considerada a variante de risco.

Na amostragem utilizada, os indivíduos homozigótos para a variante alélica A apresentam 1,67 vezes maior probabilidade de serem obesos e indivíduos heterozigótos apresentam 1,3 vezes maior probabilidade de serem obesos, em relação a indivíduos homozigóticos para a variante alélica T ⁸⁷. Existem indícios que a presença da variante alélica A, promove um aumento de expressão do gene FTO ⁹¹. Este gene, que tem 9 exões, localiza-se no cromossoma 16 e o SNP rs9939609 está localizado no primeiro intrão. Segundo o consórcio HapMap, este SNP apresenta *linkage disequilibrium* com 45 SNPs que se encontram numa zona de 45 kb ⁸⁷, entre os dois primeiros intrões e o segundo exão do gene FTO.

Para além da relevância clínica e, à semelhança do alvo anterior, a escolha deste alvo prendeu-se com razões práticas e com a possibilidade de colaboração com outros projectos a decorrer no seio do grupo.

2. Objectivos

O presente trabalho teve como objectivo principal desenvolver um sistema de *primer* universal de SBE para codificação espectral baseada em FRET para detecção simultânea de diferentes SNPs. O *primer* universal a ser desenvolvido terá de permitir a utilização do mesmo *primer* marcado com doador na análise de vários SNPs diferentes.

Especificamente pretendeu-se:

- Avaliar a ocorrência de FRET, utilizando o *primer* marcado com doador como *primer* de SBE e ddNTPs marcados com diferentes aceitantes
- Desenhar e otimizar um sistema de *primer* universal para SBE (*in silico*)
- Aplicar o *primer* universal em amostras de crescente complexidade (oligonucleótidos sintéticos e produtos de PCR)
- Aplicar o *primer* universal em produtos de PCR contendo SNP com interesse clínico

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

3.1.1.1. Reagentes químicos

Tabela 3.1. Reagentes químicos utilizados

Reagente	Fabricante
Ampicilina	Sigma-Aldrich
Ácido Bórico	
Glicerol	
Glucose	
Fenol	
Clorofórmio	Merk
Hidróxido de sódio	
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	
Cloreto de magnésio	
Acetato de sódio	
Dodecilsulfato de sódio 90% (w/v) (SDS)	Panreac
Ácido acético	
Tris(hidroxil)aminometano (Tris)	Fluka
Triptona	Difco
Agar	
Agarose	Invitrogen
NuSieve GTG Agarose	Fmc Bioproducts
Etanol absoluto	Panreac
Extracto de levedura	Usb
<i>Gel red</i>	Biotium

3.1.1.2. Reagentes biológicos

3.1.1.2.1. Enzimas

As reacções de PCR foram realizadas na presença *DreamTaq DNA polymerase* (Fermentas). Para as reacções de SBE utilizou-se a *Thermosequenase* (GE Healthcare).

3.1.1.2.2. Marcadores de pesos moleculares

Todos os géis de agarose foram efectuados na presença de *GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use* (Fermentas).

3.1.1.2.3. Oligonucleótidos de DNA e ddNTPs

Os oligonucleótidos de DNA não marcados e marcado com doador foram adquiridos à STAB-Vida, sendo utilizados sem processos de purificação posterior. Os ddNTPs marcados com os diferentes aceitantes foram adquiridos à Jena Bioscience.

Tabela 3.2. Oligonucleótidos sintéticos alvo

As bases que diferem entre os diferentes alvos encontram-se sublinhadas

Designação	Sequência (5' para 3')
TLT	gcaccagggttagcagacatgcgtggtcccatcgtctgtca
TLA	gcaccagggttagcagacatgcgtggtcccatcgtctgtca
TLC	gcaccagggttagcagacatgcgtggtcccatcgtctgtca
TLG	gcaccagggttagcagacatgcgtggtcccatcgtctgtca
Univ-TLT	actgttctcgtcgtttccgcaacaagtccttctcagacg
Univ-TLA	actgttctcgtcgtttccgcaacaagtccttctcagacg
Univ-TLC	actgttctcgtcgtttccgcaacaagtccttctcagacg
Univ-TLG	actgttctcgtcgtttccgcaacaagtccttctcagacg

Tabela 3.3. Primers universais de SBE

Designação	Sequência (5' para 3')
Univ-MYC	agcagacatgcgtggtccaggactgttgccggaacg
Univ-FTO	agcagacatgcgtggtcccatgcgactgctgtgaattt

Tabela 3.4. Primers utilizados nas reacções de PCR

Designação	Sequência (5' para 3')	Tm (°C)
C-MYC fwd	gctcatttctgaagaggactt	52,4
C-MYC rev	aggcagtttacattatggcta	51,5
FTO fwd	gcaaaatggcaacacacact	51
FTO rev	cagccaaggatgggtgtt	52

Tabela 3.5. Oligonucleótido revelador marcado com doador

Designação	Sequência (5' para 3')	Modificação (em 5')	Máximo de Absorção (nm)	Máximo de Emissão (nm)
D₁	tgggaccacgcgtgtctgtct	Alexa Fluor 430	430	530

Tabela 3.6. ddNTPs marcados com aceitantes

Designação	Modificação	Máximo de Absorção (nm)	Máximo de Emissão (nm)
ddU	Alexa Fluor 546	546	570
ddA	Alexa Fluor 568	568	602
ddC	Alexa Fluor 594	592	620
ddG	Alexa Fluor 634	634	650

3.1.1.2.4. Amostras biológicas

O clone contendo parte do exão 3 do gene C-MYC foi construído e gentilmente cedido por João Conde. O vector utilizado e a sequência do fragmento clonado são apresentados na Figuras A.1 e em A.2 no anexo A. A confirmação da clonagem foi efectuada por sequenciação, encontrando-se o fluograma de sequenciação na Figura B.1 no anexo B.

As 6 amostras biológicas contendo o gene FTO foram gentilmente cedidas por Fábio Carlos da empresa STAB-Vida. A região contendo o SNP a ser analisado foi verificada por sequenciação. Os 6 fluorogramas de sequenciação são apresentados na Figura B.2 a B.7 no anexo B.

3.1.1.2.5. Meio de cultura *Luria Bertani*

10 % (p/v) triptona

5 % (p/v) extracto de levedura

10 % de NaCl

Ajustar para pH 7 com NaOH

Autoclave

3.1.2. Equipamentos

Tabela 3.7. Equipamento utilizado

Modelo	Fabricante
DNA Engine Peltier Thermal Cycler	BioRad
Centrífuga refrigerada (3- 16K)	Sartorius
Centrífuga de bancada (1-14)	
Espectrofotómetro ND1000	NanoDrop
Gel Doc XR+ Molecular Imager system	Hellma
Espectrofluorímetro Cary Eclipse com controlo de temperatura por <i>Peltier</i>	Varian
Células de quartzo com percurso de excitação 1 cm (105.254-QS)	Hellma

3.2. Métodos

3.2.1. Condições de espectrofluorimetria

Os parâmetros de medição dos espectros de emissão encontram-se na Tabela 3.8. Traçar os espectros de emissão entre os 450 nm e os 750 nm.

Tabela 3.8. Parâmetros de medição dos espectros de emissão

Condição	Comprimento de onda de excitação (nm)	Potência do fotomultiplicador (V)	Velocidade de varrimento (nm/min)	Temperatura (°C)
1	430	800	120	20
2	430	600	600	20
3	430	800	120	20
4	430	600	120	5 a 80, com incrementos de 5
5	430	800	120	20
6	430	800	120	64

3.2.2. Espectros de emissão de ddNTPS e doadores isolados

1. Preparar 245 µl de tampão de SBE (Tris-HCl 52 mM pH 9,5 e MgCl₂ 13 mM).
2. Dividir esta solução em 4 fracções de 48 µl e numa de 47,5 µl.
3. A cada uma das fracções de 48 µl adicionar 2 µl (25 µM) de um dos ddNTPs (ddU, ddA, ddC, ddG), para concentração final de 1 µM.
4. À fracção de 47,5 µl adicionar 2,5 µl de D₁ (de solução a 10 µM), para concentração final de 0,5 µM.
5. Traçar espectros utilizando a condição 1, descrita na Tabela 3.8.

3.2.3. SBE em *templates* sintéticos utilizando oligonucleótido marcado com doador (D₁) como *primer* de SBE

3.2.3.1. Reacção com um *template* de DNA sintético e respectivo ddNTP

1. Preparar 250 µl de **solução_SBE_1** (1 µM de D₁, Tris-HCl 52 mM pH 9,5 e MgCl₂ 13 mM).
2. Aliquotar 24,5 µl desta solução e adicionar 0,5 µl do *template* TLT (50 µM) para concentração final de 1 µM.
3. Dividir a **solução_SBE_1** excedente em 4 fracções de 48,2 µl.
4. A cada fracção, adicionar do 1 µl *template* (50 µM) contendo uma base diferente na posição a ser analisada (TLA, TLT, TLC e TLG) para uma concentração final de 1 µM.
5. Adicionar 0,8 µl do ddNTP (250 µM) complementar à base a ser avaliada (ddU, ddA, ddG, ddC, respectivamente), para concentração final de 4 µM.
6. Dividir cada uma das fracções em duas de 24,38 µl.
7. Adicionar a uma das fracções 0,62 µl de *Thermosequenase* (3,2U/µl), para concentração final de 2 U. À reacção controlo, adicionar o mesmo volume em água.
8. Estas reacções sujeitas ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.9.

Tabela 3.9. Programa de ciclos térmicos utilizado nas reacções de SBE em *templates* sintéticos

Passo	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	95	60
2	95	10
3	62	30
4	Passo (2) e (3) foram repetidos 35 vezes	

9. Perfazer o volume para 50 µl com **tampão de SBE** (Tris-HCl 52 mM e MgCl₂ 13 mM).
10. Traçar os espectros de emissão utilizado a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

3.2.3.2. Precipitação da reacção de SBE com um *template* sintético de DNA e respectivo ddNTP

Às reacções preparadas na secção 3.2.3.1:

1. Adicionar $\frac{1}{10}$ do volume da reacção de acetato de sódio 3 M pH 5,4.
2. Adicionar 2 volumes de etanol absoluto.
3. Incubar durante 270 minutos a -20 °C.
4. Centrifugar amostras a 20800 ×g durante 30 minutos a 4 °C.
5. Descartar sobrenadante e lavar *pellet* com 800 µl de etanol a 70 %.
6. Centrifugar amostras a 20800 ×g durante 15 minutos a 4 °C.
7. Secar *pellet* com auxílio de *Speed Vac*.
8. Ressuspender *pellet* em 50 µl de tampão de SBE.
9. Incubar durante 15 minutos a 37 °C.
10. Traçar espectros utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

3.2.3.3. Reacção de SBE com dois *templates* de DNA sintético e dois ddNTP

1. Preparar 87,5 µl da **solução_SBE_1** (ver composição na secção 3.2.2.1).
2. Aliquotar 24,75 µl desta solução e adicionar 0,25 µl dos *templates* TLT e TLC (100 µM) para concentração final de cada *template* de 1 µM.
3. A 59,25 µl da solução reaccional excedente, adicionar 1 µl de ddA e ddG (250 µM) para concentração final de 4 µM, e adicionar 0,625 µl de TLT e TLC (100 µM), para concentração final de 1 µM de cada *template*.
4. Dividir a em duas fracções de 24,4 µl. Adicionar a uma delas 0,62 µl de *Thermosequenase* (3,2 U/µl). À reacção controlo, adicionar o mesmo volume em água.
5. Paralelamente, preparar reacções idênticas, à excepção do passo 3) onde se adiciona 0,31 µl de TLT e TLC (de solução a 100 µM), para uma concentração final de cada *template* de 0,25 µM.
6. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.9.
7. Perfazer o volume para 50 µl utilizando tampão de SBE (ver composição na secção 3.2.3.1).
8. Traçar espectros de emissão utilizado a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

3.2.3.4. Reacção de SBE com um *template* de DNA sintético e quatro ddNTP

1. Preparar 137,5 µl da solução_SBE_1 (ver composição na secção 3.2.3.1).
2. Aliquotar 24,75 µL desta solução e adicionar 0,25 µl de TLT (de solução 100 µM) para concentração final de 1 µM.

3. A 105,3 μl da solução excedente, adicionar 1,7 μl de cada ddNTP (250 μM), para concentração final de cada ddNTP de 4 μM .
4. Dividir a solução em duas fracções de 54,45 μl , adicionar 0,55 μl de TLT (100 μM) a uma e 0,55 μl de TLC (100 μM) à outra, para concentração final de 1 μM .
5. Dividir cada fracção em duas de 24,4 μl . A uma, adicionar 0,62 μl de *Thermosequenase* (3,2U/ μl) para concentração final de 8U. À reacção controlo, adicionar o mesmo volume em água.
6. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.9.
7. Perfazer o volume de cada reacção para 50 μl utilizando tampão de SBE.
8. Traçar os espectros de emissão utilizado a condição 2, descrita na Tabela 3.8.
9. Precipitar as reacções segundo o procedimento descrito na secção 3.2.3.2.
10. Traçar os espectros de emissão na condição descrita em cima.

3.2.3.5. Reacção de SBE com dois *templates* de DNA sintético e quatro ddNTP

1. Preparar as reacções como descrito na secção 3.2.3.4, no entanto, no do passo 4) adicionar TLT e TLC à mesma reacção e no passo 5) aumentar a quantidade de enzima para 8U (0,25 μl de solução a 32U/ μl).
2. Traçar os espectros de emissão, antes e após precipitação, utilizando a condição 2 descrita na Tabela 3.8.

3.2.4. Reacções de SBE com *primer* universal em sequências de DNA sintético contendo uma porção do gene C-MYC

3.2.4.1. Reacção de SBE com um *template* de DNA sintético e respectivo ddNTP

1. Preparar 205 μl da **solução_SBE_2** (1 μM de *primer* universal Univ-MYC, Tris-HCl 52 mM pH 9,5 e MgCl_2 13 mM, 64 U de *Thermosequenase*).
2. Dividir solução em 4 fracções de 49,5 μl .
3. Adicionar 0,5 μl de 1 *template* (100 μM) a cada fracção (Univ-TLA, Univ-TLT, Univ-TLC, Univ-TLG).
4. Dividir cada uma das fracções em duas de 24,6 μl . A uma delas adicionar 0,4 μl do ddNTP (250 μM) complementar ao *template* em solução, para concentração final de 4 μM . À outra, adicionar o mesmo volume de dNTP não marcado, para a mesma concentração final.
5. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.10.

Tabela 3.10. Programa de ciclos térmicos utilizados para as reacções de SBE em *templates* sintéticos contendo uma porção de C-MYC

Passo	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	95	60
2	95	30
3	56	60
4	58	60
5	Passo (2) a (4) foram repetidos 30 vezes	

6. Perfazer o volume até 47,5 µl utilizando tampão de SBE.
7. Traçar espectros de emissão utilizado a condição 3, descrita na Tabela 3.8.
8. Adicionar 2,5 µl de D₁ (10 µM) a cada uma das reacções, para uma concentração final de 0,5 µM.
9. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.11.

Tabela 3.11. Programa de ciclos térmicos utilizados para a hibridação de D₁ com *primer* universal

Passo	Temperatura	Tempo
Desnaturação	95 °C	10 minutos
Hibridação	95 °C até 20 °C	0,1 °C/s
Repouso	20 °C	17 minutos

10. Traçar espectros de emissão utilizado a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

3.2.4.2. Reacção com *template* de DNA sintético na presença de dois ddNTP

1. Preparar 175,7 µl da **solução_SBE_3** (1 µM de *primer* universal Univ-MYC, Tris-HCl 52 mM pH 9,5 e MgCl₂ 13 mM).
2. Aliquotar 24,5 µl desta solução e adicionar 0,5 µl de Univ-TLT (50 µM), para concentração final de 1 µM.
3. A 147,5 µl da solução excedente, adicionar 1,22 µl de ddA e de ddU (250 µM), para concentração final de 2 µM.
4. Dividir esta solução em 3 fracções de 49,5 µl e adicionar 0,5 µl de Univ-TLT (100 µM) à primeira fracção; 0,5 µl de Univ-TLA (100µM) à segunda fracção; 0,25 µl de Univ-TLA (100µM) e 0,25 µl de Univ-TLT (100µM) à terceira fracção.
5. Dividir cada fracção em duas de 24,75 µl e a uma delas adicionar 0,25 µl de *Thermosequenase* (32U/µl) para concentração final de 8U. À reacção controlo, adicionar o mesmo volume em água.

6. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.10.
7. Após o programa de ciclos térmicos, perfazer cada reacção até 47,5 µl com tampão de SBE.
8. Adicionar 2,5 µl de D₁ (10 µM) para uma concentração final de 0,5 µM.
9. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.11.
10. Traçar espectros de emissão utilizado a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

3.2.4.3. Reacção com *template* de DNA sintético na presença de quatro ddNTP

1. Preparar 55 µl da **solução_SBE_4** (1 µM de *primer* universal Univ-MYC, 1 µM de *template* Univ-TLT, Tris-HCl 52 mM pH 9,5 e MgCl₂ 13 mM e os 4 ddNTPs para uma concentração final de cada um de 2 µM)
2. Dividir a solução em duas fracções de 24,75, adicionar a uma delas 0,25 µl de *Thermosequenase* (32U/µl), para concentração final de 8 U. À reacção controlo, adicionar o mesmo volume em água.
3. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.10.
4. Perfazer o volume de cada reacção até 47,5 µl com tampão de SBE.
5. Adicionar 2,5 µl D₁ (de solução a 10 µM) para concentração final de 0,5 µM.
6. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.11.
7. Traçar os espectros de emissão utilizado a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

3.2.5. Reacções de SBE com *primer* universal em alvos correspondentes a produtos de PCR de C-MYC

3.2.5.1. Extracção de DNA plasmídico

A extracção de DNA plasmídico (pDNA) foi adaptado do método de lise alcalina descrito por Sambrook *et. al.*⁹²

1. Inocular 40 mL de meio rico (LB), contendo 150 µg/mL de Ampicilina, com 20 µl de *E. Coli* DH5α transformadas com o plasmídeo pGFP (código de acesso Genbank: U17997), no qual foi clonado parte do exão 3 do gene C-MYC (referência NCBI: NM_002467.4).
2. Incubar o meio inoculado a 320 rpm, 37 °C durante 12 horas.
3. Transferir as células para tubo de microcentrifuga de 1,5 ml.
4. Centrifugar durante 15 minutos a 6659 ×g durante 15 minutos.
5. Descartar sobrenadante e transferir mais 1,5 ml de meio de cultura.
6. Centrifugar durante 15 minutos a 6659 ×g durante 15 minutos.
7. Ressuspender as células em 100 µL de **solução de lise 1** (50 mM de glucose 10 mM de EDTA 25 mM Tris-HCl).

8. Manter em gelo por 5 minutos.
9. Adicionar 300 μ l da **solução de lise 2** (1% SDS, 200 mM de NaOH).
10. Misturar por inversão.
11. Manter em gelo durante 20 minutos.
12. Adicionar 225 μ l de **solução de lise 3** (3M acetato de sódio pH 4,8) e misturar por inversão.
13. Incubar em gelo durante 20 minutos.
14. Centrifugar a 15493 \times g durante 15 minutos (4 °C).
15. Transferir o sobrenadante para um tubo de microcentrífuga novo.
16. Adicionar o mesmo volume de fenol e misturar em vortex durante 1 minuto.
17. Centrifugar a amostra a 15500 g durante 3 minutos (temperatura ambiente).
18. Remover fase aquosa para um tubo novo e adicionar o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).
19. Misturar em vortex durante 1 minuto.
20. Centrifugar a 9000 g durante 3 minutos.
21. Remover fase aquosa e transferir para novo tubo de microcentrífuga.
22. Adicionar RNase (1:50 volume total) e incubar pelo menos 4 horas a 37 °C.
23. Repetir passos 16 a 21.
24. Adicionar $\frac{1}{10}$ de volume de acetato de sódio 3 M pH 7.5 e dois volumes de etanol 100%.
25. Incubar a -20 °C durante 4 horas.
26. Centrifugar a 17968 \times g durante 15 minutos a 4 °C.
27. Descartar sobrenadante.
28. Lavar com etanol a 70% e secar durante 5 minutos com o auxílio de *Speed Vac*.
29. Ressuspender o *pellet* em 100 μ l de água bidestilada e filtrada.
30. Hidratar DNA durante 15 minutos a 37 °C.
31. Quantificar por Uv-Vis e avaliar integridade por electroforese em gel de agarose.

3.2.5.2. Geração de alvos por PCR

1. Para 377,5 µl de reacção de PCR, preparou-se a mistura reaccional descrita na Tabela 3.12.

Tabela 3.12. Mistura reaccional utilizada para a obtenção de produtos de PCR de C-MYC

Componente	Concentração stock	Concentração na reacção	Volume (µl)
<i>Primer FWD</i>	5 µM	0,075 µM	5,66
<i>Primer REV</i>	5 µM	0,075 µM	5,66
dNTP <i>mix</i>	5 mM	0.2 mM	15
Tampão	10 ×	1 ×	37,75
Taq DNA polimerase	5 U/µl	1 U	3,02
H ₂ O	-	-	310,3

2. A esta mistura reaccional retirar 24,34 µl e adicionar 0,56 µl de água para a realização de controlo negativo.
3. À mistura reaccional excedente, adicionar 141 ng de DNA plasmídico.
4. Aliquotar este volume reacções de 25 µl.
5. Submeter estas reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.13.

Tabela 3.13. Programa de ciclos térmicos utilizado para a obtenção de produtos de PCR de C-MYC

Passo	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	95	60
2	95	30
3	62	30
4	72	30
5	Passo (2) a (4) foram repetidos 26 vezes	
6	72	600

6. Após o programa de ciclos térmicos, condensar as reacção num único tubo e realizar uma precipitação de DNA, segundo o procedimento descrito na secção 3.2.3.2. No entanto, ressuspender os produtos de PCR 200 µl de água bi-destilada, autoclavada e filtrada.
7. Quantificar por Uv-Vis e avaliar integridade por electroforese em gel de agarose.

3.2.5.3. Perfil de desnaturação de reacção de SBE em produto de PCR do gene C-MYC na presença de ddATP

1. Preparar 87,75 µl de **solução_SBE_5** (1µM *primer* universal Univ-MYC, Tris-HCl 52 mM pH 9,5 e MgCl₂ 13 mM, 72 ng de produto de PCR de C-MYC).
2. Aliquotar 22,5 µl desta solução.

3. A 62 μ l da solução excedente, adicionar 0,5 μ l de ddA (de solução a 250 μ M) para uma concentração final de 2 μ M.
4. Dividir em duas fracções de 24,75 μ l, adicionar a uma delas 0,25 μ l de *Thermosequenase* (32U/ μ l), para concentração final de 8 U. À reacção controlo, adicionar o mesmo volume de água.
5. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.10.
6. Perfazer o volume para 47,5 μ l com tampão de SBE.
7. Adicionar 2,5 μ l D₁ (10 μ M), para uma concentração final de 0,5 μ M.
8. Como controlos adicionais, preparar 3 reacções idênticas às anteriores, mas:
 - 8.1 Controlo 1: substituir ddA marcado por ddA não marcado.
 - 8.2 Controlo 2: substituir D₁ por *primer* de igual sequência, mas sem marcação.
 - 8.3 Controlo 3: Substituir produto de PCR de C-MYC, por *template* não complementar.
9. Traçar espectros de emissão utilizado a condição 4, descrita na Tabela 3.8. A cada incremento de temperatura, aguardar 2 minutos para estabilização.

3.2.5.4. Hibridação ao longo do tempo de D₁ com *primer* universal após reacção de SBE na presença de ddATP

1. Preparar 62,5 μ l da **solução_SBE_3** (ver secção 3.2.3.2), e adicionar 48 ng de produto de PCR do gene C-MYC e ddA para uma concentração final de 2 μ M – **solução_SBE_6**.
2. Dividir a solução em duas de 24,75 μ l, adicionar a uma delas 0,25 μ l de *Thermosequenase* (de solução a 32U/ μ l), para concentração final de 8 U. À reacção controlo, adicionar o mesmo volume de água.
3. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.10.
4. Perfazer o volume das reacções até 47,5 μ l com tampão de SBE.
5. Adicionar 2,5 μ l de D₁ (10 μ M) para concentração final de 0,5 μ M.
6. Traçar espectros de emissão utilizado as condições 5 e 6, descrita na Tabela 3.8.

3.2.6. Reacções de SBE com *primer* universal em produtos de PCR de FTO

3.2.6.1. Extracção de DNA genómico

O DNA genómico foi extraído da saliva de pacientes através do kit ‘*prepGEM™ Storage Card Saliva*’ segundo as instruções do fabricante.

3.2.6.2. Geração de alvos por PCR

1. Para 1260 μ l de reacção de PCR, preparar a mistura reaccional descrita na Tabela 3.14.

Tabela 3.14. Mistura reaccional para a obtenção de produtos de PCR do gene FTO

Componente	Concentração stock	Concentração na reacção	Volume (µl)
<i>Primer FWD</i>	5 µM	0,1 µM	25,2
<i>Primer REV</i>	5 µM	0,1 µM	25,2
dNTP <i>mix</i>	5 mM	0,2 mM	50,4
Tampão	10 ×	1 ×	126
Taq DNA polimerase	5 U/µl	1 U	8,4
H ₂ O	-	-	1025,2

2. A esta mistura reaccional, retirar 24,7 µl e adicionar 0,3 µl de água (controlo negativo).
3. Dividir a mistura reaccional excedente em 6 fracções e adicionar 98,8 ng dos respectivos *templates* a cada fracção.
4. Aliquotar cada fracção em reacções de 50 µl.
5. Submeter as reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.15.

Tabela 3.15. Programa de ciclos térmicos utilizados para a obtenção de produtos de PCR de FTO

Passo	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	95	60
2	95	30
3	56	60
4	72	40
5	Passo (2) a (4) foram repetidos 26 vezes	
6	72	600

6. Precipitar as reacções sobre cada *template*, segundo o procedimento descrito na secção 3.2.2.2., mas ressuspender os produtos de PCR em 100 µl de água bi-destilada, autoclavada e filtrada.
7. Quantificar por Uv-Vis e avaliar integridade por electroforese em gel de agarose.

3.2.6.3. Purificação de produtos de PCR por extracção de gel de agarose

1. Realizar electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos na secção anterior.
2. Excisar as bandas de interesse, protegidas de UV.
3. Incubar a -80 °C durante 16 horas.
4. Centrifugar a 16000 ×g durante 20 min, a 20 °C.
5. Transferir o sobrenadante para um tubo de microcentrifuga novo.
6. Repetir passo 4 e 5.

7. Seguir procedimento descrito na secção 3.2.2.2., mas ressuspender em 10 µl de água bidestilada, autoclavada e filtrada.
8. Quantificar por espectroscopia de Uv-Vis e analisar integridade por electroforese em gel de agarose.

3.2.6.4. SBE em produtos de PCR de FTO na presença de dois ddNTPs

1. Preparar 180 µl da **solução_SBE_7** (1 µM de *primer* Univ-FTO, Tris-HCl 52 mM pH 9,5 e MgCl₂ 13mM).
2. Aliquotar 24 µl desta solução e adicionar 38 ng de um *templates* a ser analisado.
3. A 153,5 µl da solução excedente, adicionar 1,24 µl de ddA e ddU (250 µM), para concentração final de 2 µM.
4. Dividir a solução em 3 fracções e adicionar o respectivo *template* a analisar.
5. Dividir cada fracção em duas de 24,75 µl, adicionar 0,25 µl de *Thermosequenase* (32U/µl). À reacção controlo, adicionar o mesmo volume em água.
6. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos apresentado na Tabela 3.16.

Tabela 3.16. Tabela de programa de ciclos térmicos utilizados para as reacções de SBE em produtos de PCR do gene FTO

Passo	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	95	60
2	95	30
3	43	105
4	50	105
5	Passo (2) a (4) foram repetidos 35 vezes	

7. Perfazer cada reacção até 47,5 µl com tampão de SBE.
8. Adicionar 2,5 µl D₁ (10 µM) para concentração final de 0,5 µM.
9. Submeter reacções ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.11.
10. Traçar espectros de emissão utilizado a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

4. Resultados e Discussão

4.1. Espectros isolados de doador e de aceitantes

Com o objectivo de determinar o perfil e identificar os máximos de emissão dos fluoróforos presentes na reacção de SBE (oligonucleótido marcado com doador (D_1) e dideoxinuclótidos marcados com diferentes aceitantes (ddNTPs), foram registados espectros de emissão de componente - Figura 4.1. O critério da escolha destes fluoróforos foi previamente descrito ⁷⁵. Para tal, utilizou-se como comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) os 430 nm, uma vez que este valor corresponde ao máximo de absorção do doador utilizado. Optou-se por este λ_{exc} uma vez que se pretende excitar directamente o doador e a avaliar da resposta dos aceitantes. Caso todos os parâmetros para que FRET ocorra sejam cumpridos (ver secção 1.2), a excitação directa do doador leva à transferência de energia para o aceitante ⁶⁵. Desta forma, a irradiação das reacções ao máximo de absorção do doador e analisando a resposta dos aceitantes, é possível determinar qual o par doador/aceitante presente em solução e, assim, o aceitante (ddNTP) incorporado.

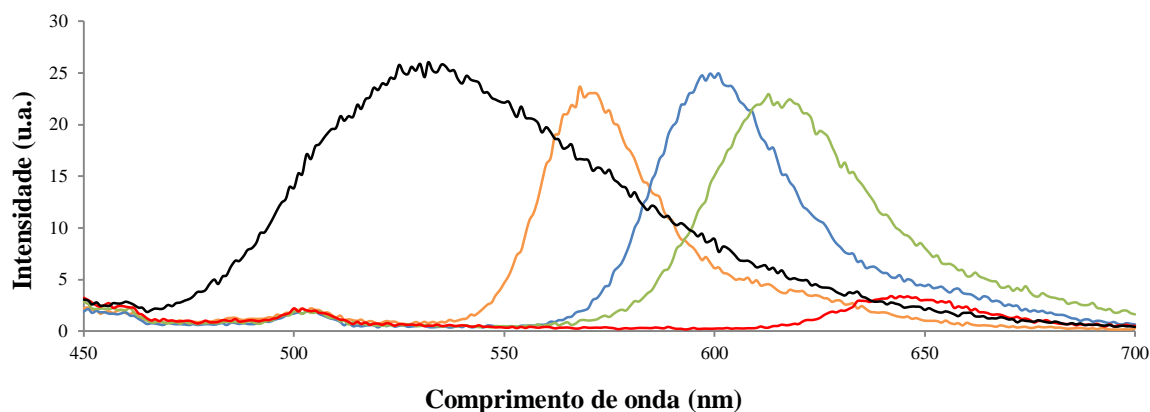


Figura 4.1. Espectros de emissão do doador e diferentes aceitantes

A linha a preto representa o doador; a linha laranja representa o ddU; a linha azul representa o ddA; a linha verde representa o ddC e a linha a vermelho representa o ddG. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 1, descrita na Tabela 3.8.

Nesta figura verifica-se a presença de 5 máximos de emissão. A banda de emissão que se encontra centrada a 530 nm corresponde ao doador e as restantes bandas de emissão correspondem aos aceitantes (ddU - máximo a 570 nm; ddA - máximo a 600 nm; ddC - máximo a 612 nm; ddC – máximo a 650 nm). Isto demonstra que os aceitantes utilizados, apresentam absorção a este comprimento de onda (λ_{exc} do doador). Tendo em conta a ocorrência de excitação dos aceitantes ao máximo de absorção do doador, o sucesso da reacção de SBE não foi confirmada pelo aparecimento da banda de emissão do aceitante, mas sim pelo aumento da sua intensidade (devido à transferência de energia pelo doador). Considerando a excitação cruzada dos aceitantes, a determinação da incorporação de um dos ddNTP, pode ser impedida pela presença dos restantes ddNTPs, pelo que os métodos que envolvem vários fluoróforos estão restringidos à detecção de um número reduzido de eventos moleculares, de forma a minimizar respostas dúbias/incorrectas.

O modelo apresentado por Giestas *et al.*, permite a minimização destas respostas dúbias/incorrectas. No entanto, este modelo foi desenvolvido para situações em que mais que um doador é utilizado (situação em que o modelo de codificação espectral se torna relevante). Apesar de nesta tese não ser utilizado o modelo matemático de codificação espectral que permite a descodificação dos sinais de FRET, este trabalho visa ao desenvolvimento de um primer universal de SBE para codificação espectral, que permita a utilização da mesmo oligonucleótido marcado com doador para a análise de vários SNPs.

Desta forma, a identificação dos pares doadores/aceitantes foi feita através da análise dos espectros de emissão.

4.2. SBE em *templates* sintéticos utilizando D₁ como *primer* de SBE

A presente secção teve como principal objectivo avaliar se reacções de SBE utilizando D₁ como *primer* de SBE e ddNTPs marcados com aceitantes permitem a identificação inequívoca (através de FRET) da incorporação de ddNTPs em D₁.

4.2.1. Reacção com um *template* de DNA sintético e respectivo ddNTP

Com o objectivo de verificar a ocorrência de SBE através de FRET, utilizou-se D₁ (ver Tabela 3.5) como *primer* de SBE. Como *templates*, foram utilizados 4 oligonucleótidos sintéticos (TLT, TLA, TLC e TLG – ver Tabela 3.2) idênticos, à excepção da base que ocupa a posição a ser analisada. Desta forma, é possível averiguar se a enzima utilizada (*Thermosequenase*⁵⁰) tem capacidade para incorporar os 4 ddNTPs (ddU, ddA, ddC, ddG) marcados com diferentes aceitantes.

Numa primeira abordagem, traçaram-se os espectros de emissão da reacção de SBE na presença de ddA e do *template* TLT e da reacção controlo (sem enzima) - Figura 4.2 a). Através da reacção controlo é possível obter a intensidade dos aceitantes em solução na ausência de reacção de SBE e, consequentemente, na ausência de FRET (na ausência de enzima, não ocorre a incorporação de ddNTPs em D₁). É de referir que, nas concentrações utilizadas, a distância média entre o doador (presente em D₁) e os aceitantes (presente em ddA) não incorporados é incompatível com a ocorrência de FRET. A distância média entre os fluoróforos utilizados só passa a ser compatível com FRET numa concentração na ordem dos milimolar⁷⁶. Por outro lado, na reacção de SBE (presença de enzima), seria suposto que o ddA presente em solução fosse incorporado em D₁, diminuindo a distância entre o doador e o aceitante, para uma compatível com FRET. Desta forma, através da comparação entre as intensidades da banda de emissão dos aceitantes na reacção de SBE com a reacção controlo, é possível inferir se ocorreu ou não a reacção de SBE.

Como o sucesso da reacção de SBE e a identificação do aceitante incorporado no *primer* pode ser inferido pelo aumento de intensidade da banda de emissão do respectivo aceitante, removeu-se

matematicamente a banda de emissão do doador - Figura 4.2 b). Esta remoção teve como objectivo facilitar a análise espectral.

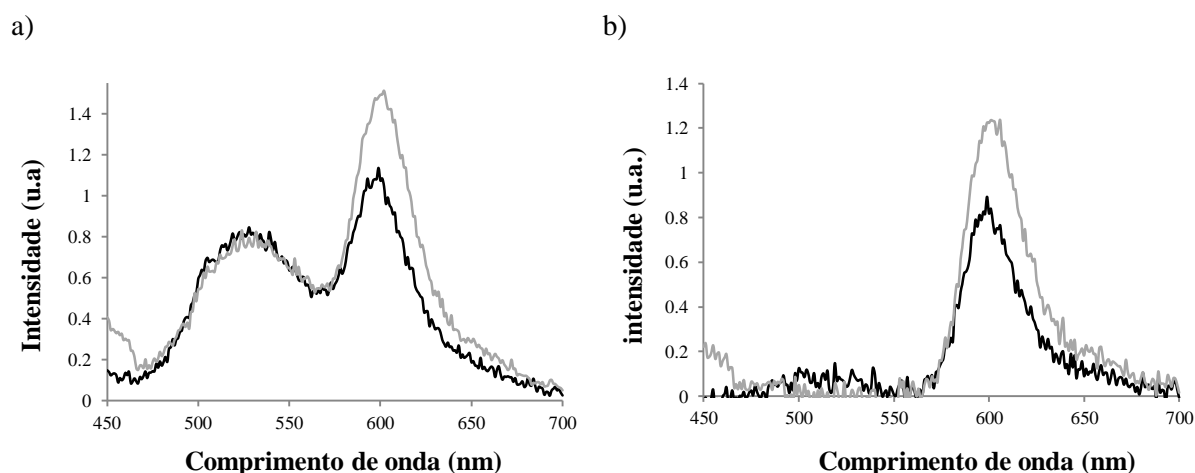


Figura 4.2. Espectros de emissão das reacções de SBE, e reacção controlo, com *template* TLT na presença de ddA

a) Espectros de emissão não tratados; b) Espectros de emissão removendo a banda de emissão de doador
A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Espectros de emissão traçados utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

Pela a análise da Figura 4.2 a) é possível observar na reacção de SBE (linha a cinzento) um ligeiro decréscimo na intensidade de emissão do doador e um aumento na intensidade na banda de emissão do aceitante ddA (emissão a 600 nm), quando comparada com a reacção controlo (linha a preto). O aumento de intensidade na emissão do aceitante também é observável na Figura 4.2 b). Este aumento de emissão indica que o ddA foi incorporado no *primer* marcado com o doador (D_1). Esta incorporação foi confirmada através da precipitação destas reacções, tendo esta como objectivo, separar D_1 dos aceitantes não incorporados⁹³. Como a eficiência de precipitação de ácidos nucleicos é dependente do seu tamanho⁹⁴, D_1 é separado dos restantes componentes, permitindo verificar se a reacção de SBE foi bem sucedida.

Na Figura 4.3 encontra-se o espectro de emissão obtido após precipitação da reacção com TLT e ddA. Estes espectros não foram sujeitos ao tratamento matemático descrito anteriormente, uma vez que a banda de emissão do doador é necessária para a averiguação do sucesso da precipitação.

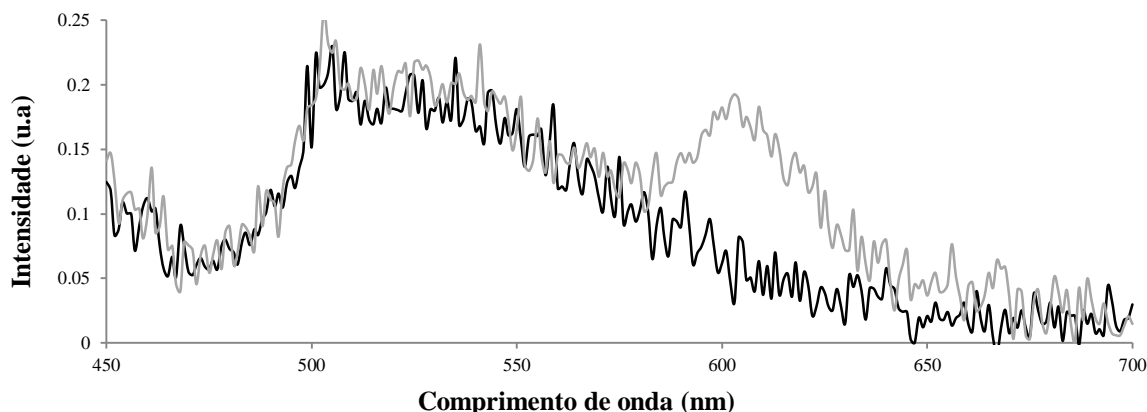


Figura 4.3. Espectros de emissão da precipitação de reacção de SBE, e reacção controlo, com *template* TLT na presença de ddA

A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Espectros de emissão traçados utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

É possível observar na Figura 4.3, a presença da banda de emissão do doador em ambas as reacções (com e sem enzima) indicando que, para ambas as reacções, a precipitação de D_1 foi bem sucedida. No entanto, a banda de emissão de ddA só é observável na reacção de SBE (linha a cinzento) evidenciando que, na presença de enzima, o ddA foi incorporado em D_1 . Este resultado indicando que o ddA foi incorporado em D_1 com sucesso.

A reacção descrita anteriormente também foi realizada para os *templates* TLA, TLG, TLC (ver Tabela 3.2) com os respectivos ddNTPs complementares (ddU, ddC, ddG, respectivamente). Os espectros de emissão resultantes com a banda de emissão do doador removida são apresentadas nas Figuras D.1 I), D.2 I), D.3 I) no anexo D. Os espectros de emissão das precipitações das reacções em TLA, TLC, TLG com os respectivos ddNTPs encontram-se nas Figuras D.1 II), D.2 II), D.3 II), respectivamente no Anexo D.

Em todas estas reacções observa-se um acréscimo na banda de emissão dos aceitantes indicando, por isso, que reacção de SBE foi bem sucedida. Através da análise dos espectros de emissão das reacções precipitadas, verifica-se que as reacções realizadas com o *template* TLT (Figura 4.3) e com o *template* TLC (Figura D.3 II) no Anexo D) são as que apresentam a banda de emissão dos respectivos ddNTPs de forma mais clara. Desta forma, prosseguiu-se o trabalho utilizando TLT e TLC como *template* e respectivos ddNTPs.

4.2.2. Reacção de SBE com dois *templates* de DNA sintético e dois ddNTP

De forma a verificar a possibilidade de utilização deste sistema para analisar dois *locus* na mesma reacção, foram efectuadas reacções na presença de dois *templates* sintéticos (TLT e TLC), com o objectivo de mimetizar um genótipo heterozigótico.

Numa primeira abordagem, a concentração final dos *templates* foi mantida constante, face aos ensaios anteriores (0,5 μM de cada *template*), de forma a verificar se é possível discriminar a incorporação de ddA e o ddG na mesma reacção – Figura 4.4 a).

Numa segunda abordagem, a concentração de cada *template* foi reduzida para metade (0,25 μM de cada *template*) – Figura 4.4 b) - para mimetizar um heterozigótico de uma forma mais correcta, uma vez que cada alelo representa 50% dos alvos disponíveis.

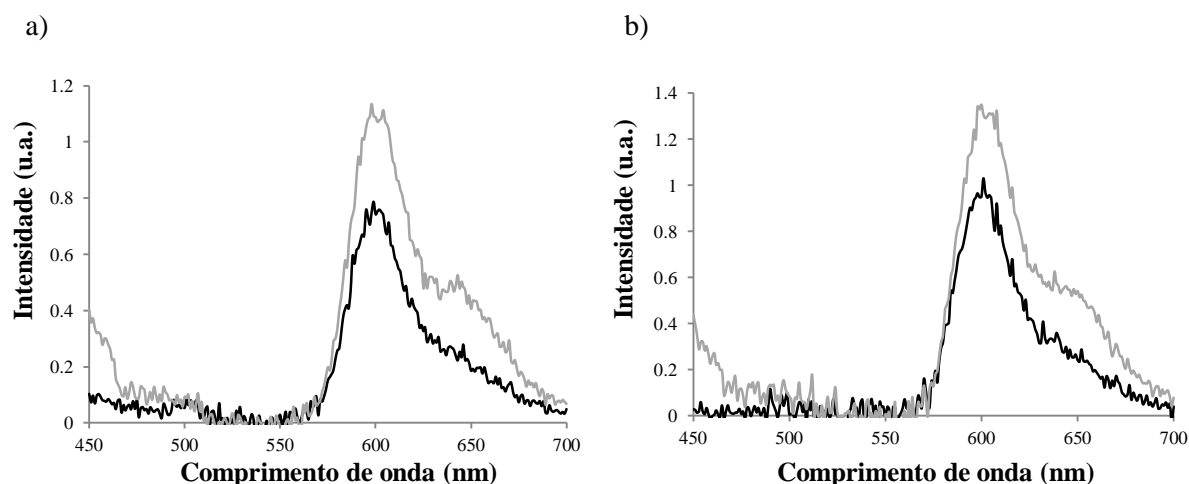


Figura 4.4. Espectros de emissão das reacções de SBE, e reacções controlo, com os *templates* TLC e TLT na presença de ddA e ddG

a) reacções com *templates* TLC e TLT a 0,5 μM ; b) reacções com *templates* TLC e TLT a 0,25 μM .

A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Em ambos os espectros de emissão, a banda de emissão do doador foi removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

Pela Figura 4.4 verifica-se que, quando se utiliza TLT e TLC a 0,5 μM ou a 0,25 μM , o perfil dos espectros de emissão da reacção de SBE (com enzima) e o de controlo (sem enzima) são diferentes. Estes espectros demonstram que as intensidades das bandas de emissão de ddA (600 nm) e de ddG (650 nm) são superiores às mesmas bandas de emissão nas reacções controlo. Isto indica que ddA e ddG foram, de facto, incorporados em D_1 em ambos os casos.

Através da comparação dos espectros de emissão das reacções de SBE (linha a cinzento) apresentados nesta figura, verifica-se que a diferença entre as intensidade das bandas de emissão dos aceitantes (ddA e ddG) não é significativa. Isto é indicativo de que, em ambos os casos, a quantidade de *template* utilizado permite a discriminação da incorporação dos respectivos ddNTPs em D_1 .

4.2.3. Reacção de SBE com um *template* de DNA sintético e quatro ddNTP

De seguida, pretendeu-se averiguar a capacidade de discriminação da incorporação de um ddNTP específico em D_1 na presença dos 4 ddNTPs. Para tal, traçaram-se os espectros de emissão da reacção de SBE na presença de TLT e dos 4 ddNTPs, sendo a banda do doador removida matematicamente - Figura 4.5. A utilização de 4 ddNTPs, na mesma reacção, seria útil em situações

de *multiplex*, por exemplo na análise de dois SNPs formados pelas 4 variantes possíveis (ex. SNP 1 – A/T ; SNP 2 - G/C).

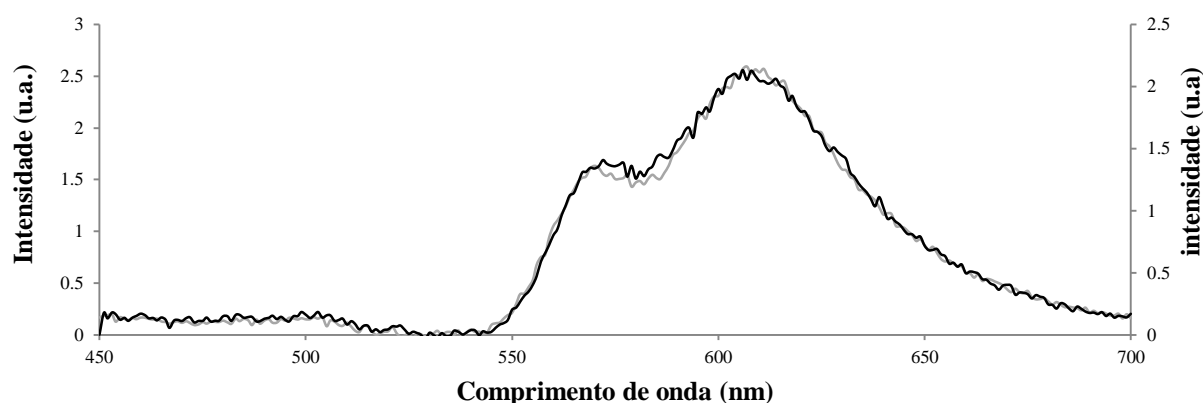


Figura 4.5. Espectros de emissão das reacção de SBE, e reacção controlo, com *template* TLT na presença dos 4 ddNTPs

A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Em ambos os espectros de emissão, a banda de emissão do doador foi removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

Pela a análise da Figura 4.5 verifica-se que tanto a reacção de SBE (linha a cinzento) como a reacção controlo (linha a preto) apresentam exactamente o mesmo perfil. Isto significa que não existe um aumento significativo nas bandas de emissão dos diferentes aceitantes na reacção de SBE, em comparação com a reacção controlo. Desta forma, não foi possível discriminar a incorporação de um dos ddNTP em D₁ na presença dos 4 ddNTPs.

Seria expectável um incremento na emissão a 600 nm (emissão de ddA), uma vez que seria este aceitante a ser incorporado em D₁, devido à presença de timina na posição avaliada. O facto de não se ter observado nenhum incremento na emissão a este comprimento de onda, indicou que a reacção de SBE ou não ocorreu ou a sua eficiência foi demasiado baixa. Este facto pode dever-se à competição, entre o ddA e os restantes ddNTPs em solução pelo centro activo da enzima *Thermosequenase*.

Assim sendo, o número de moléculas de D₁ no qual o ddA foi incorporado pode ter sido tão reduzido, que a transferência de energia entre o doador e o aceitante não foi suficiente para se observar um acréscimo na banda de emissão de ddA, ou seja, que o ruído dos aceitantes não incorporados impossibilitem a identificação do par doador/aceitante formado⁵³.

De forma a confirmar se o ddA foi de facto incorporado em D₁ realizou-se a precipitação destas reacções – Figura 4.6.

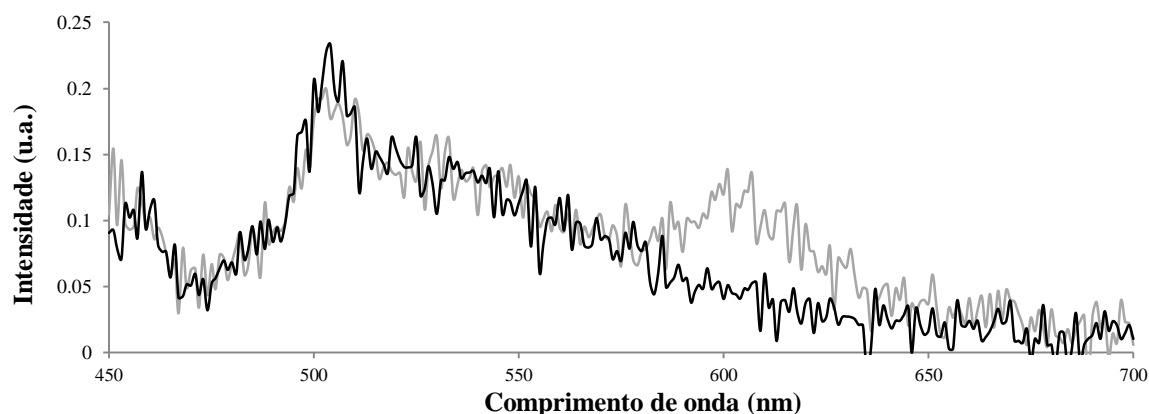


Figura 4.6. Espectros de emissão da precipitação de reacção de SBE, e reacção controlo, com *template* TLT na presença dos 4 ddNTPs
A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Espectros de emissão traçados utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

Nesta figura, observa-se uma banda de emissão em torno dos 600 nm no espectro de emissão correspondente à reacção de SBE. Considerando que o aceitante que emite nesta gama de comprimentos de onda é o ddA e que este é complementar ao nucleótido que se encontra no *template* (timina na posição analisada) é possível inferir que incorporação de ddA em D₁ foi bem sucedida. Assim sendo, antes da precipitação (Figura 4.5.) não se observou um acréscimo na emissão a 600 nm, devido à emissão dos ddNTPs não incorporados (ruído) que impossibilitou a detecção deste aumento. É de referir que a ausência das bandas de emissão dos restantes aceitantes demonstra que a precipitação permite a purificação da reacção de SBE e que a enzima utilizada é fiel ao *template*, isto é, promove a incorporação do ddNTP complementar à base questionada no *template*.

O espectro de emissão da reacção de SBE em TLC na presença dos 4 ddNTPs (com a banda de emissão do doador removida) é apresentado na Figura D.4. I) no anexo D. Neste caso, a sobreposição dos espectros de emissão da reacção de SBE com o respectivo controlo negativo, revela um ligeiro aumento na emissão em torno dos 650 nm (comprimento de onda de emissão de ddG), na reacção de SBE. Tal indica que a incorporação de ddG em D₁ foi bem sucedida. No entanto, este aumento foi demasiado baixo para se poder garantir a ocorrência de SBE. De forma a averiguar o sucesso desta reacção de SBE, estas reacções foram precipitadas e observa-se um aumento na emissão em torno dos 650 nm, em comparação ao controlo, indicando que a incorporação de ddG em D₁ foi bem sucedida. – Figura D.4 II) no anexo D. Tal sugere que o aumento de emissão a 650 nm na reacção de SBE (antes da precipitação – Figura D.4. I)) se pode dever à ocorrência de FRET.

4.2.4. Reacção de SBE com dois *templates* de DNA sintético e quatro ddNTP

Os resultados apresentados nesta secção têm como objectivo averiguar se é possível a utilização deste sistema na presença de dois *templates* e dos 4 ddNTPs. Tendo em conta os resultados da secção anterior (secção 4.2.3), optou-se por aumentar a quantidade de enzima para 8U por reacção (ao invés

de 2U). Assim sendo, traçaram-se os espectros de emissão da reacção de SBE com TLT e TLG na presença dos 4 ddNTPs. A banda de emissão do doador foi removida matematicamente – Figura 4.7.

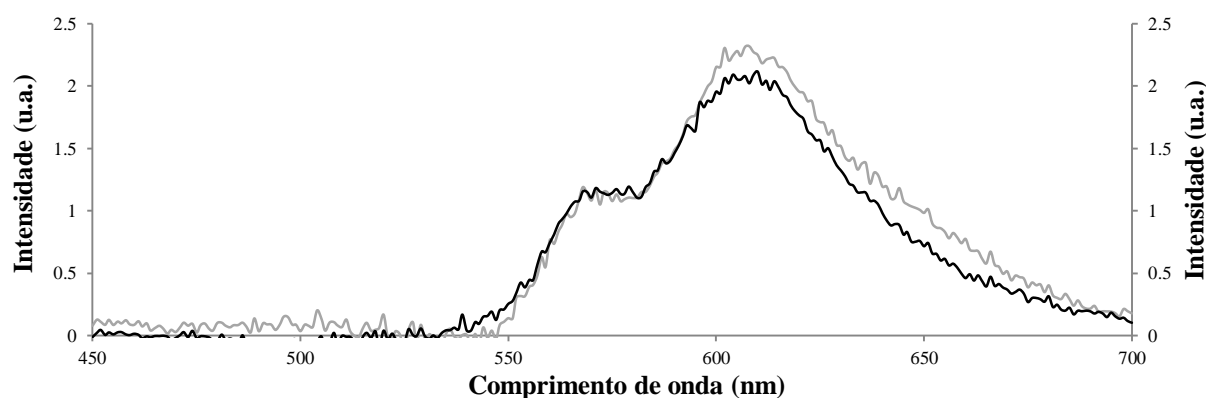


Figura 4.7. Espectros de emissão das reacções de SBE, e reacções controlo, com os *templates* TLC e TLT na presença de 4 ddNTPs

A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima).. Em ambos os espectros de emissão, a banda de emissão do doador foi removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

Nesta figura observa-se que os espectros de emissão da reacção de SBE e o espectro de emissão do controlo negativo não são sobreponíveis, uma vez que o espectro de emissão da reacção de SBE apresenta bandas de emissão mais intensas em torno dos 600 nm (indicando uma possível incorporação de ddA) e em torno dos 650 nm (indicando uma possível incorporação de ddG). Desta forma, o aumento de enzima de 2 U para 8 U, permitiu o aumento do número de ddNTPs incorporados em D_1 . Verifica-se também que a banda de emissão de ddU (máximo de emissão a 570 nm) apresenta o mesmo de perfil (estão sobrepostas) na reacção de SBE e na reacção controlo. Isto indica que o doador não transferiu energia para este aceitante, o que é expectável, pois em solução não existe *template* que permita a incorporação de ddU em D_1 . De forma a confirmar a ocorrência da incorporação destes ddNTPs em D_1 , estas reacções foram precipitadas – Figura 4.8.

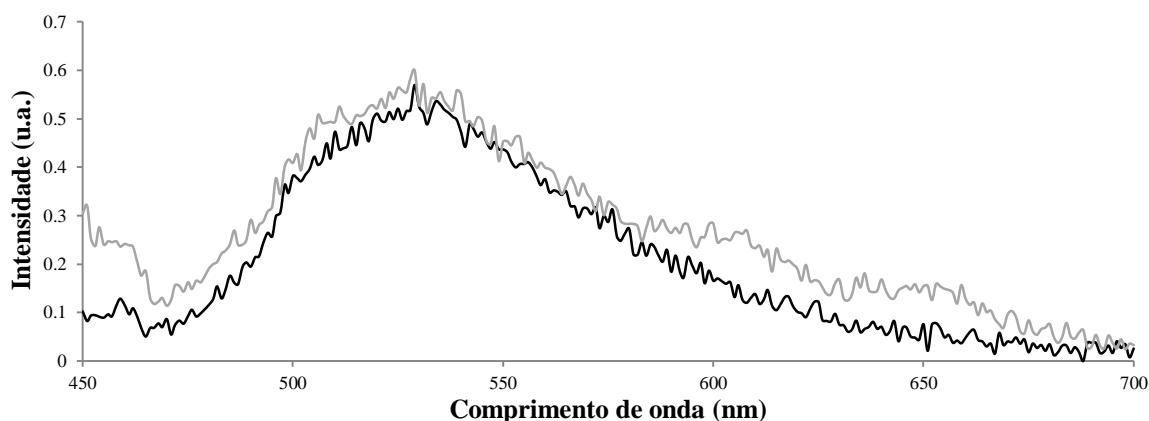


Figura 4.8. Espectros de emissão da precipitação de reacção de SBE, e reacção controlo, com *template* de TLT e TLC na presença dos 4 ddNTPs. A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Espectros de emissão traçados utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

Nesta figura observam-se duas bandas de emissão na reacção de SBE que correspondem à incorporação de ddA (emissão a 600nm) e à incorporação de ddG (emissão a 650 nm). Estas duas bandas não estão presentes na reacção controlo, indicando por isso que a presença destas se deve à incorporação de ddA e de ddG em D_1 e não à precipitação inespecífica destes ddNTPs.

Considerando os resultados obtidos, foi possível concluir que a utilização de um *primer* marcado com o doador e a utilização destes ddNTPs marcados com diferentes aceitantes, permitiu a identificação do nucleótido que se encontra na posição analisada. Desta forma, continuou-se o trabalho utilizando o *primer* universal.

4.3. Construção do *primer* universal de SBE para Codificação Espectral

Nesta secção propõe-se o desenvolvimento de um *primer* universal de SBE para codificação espectral (a partir de agora designado como *primer* universal) que permita a utilização do mesmo oligonucleótido revelador marcado com doador (D_1) para a análise de SNPs em meio homogéneo, sem serem necessários passos posteriores de purificação. A utilização deste *primer* universal, permite que o mesmo D_1 (componente mais caro da reacção) possa ser utilizado para a análise de diferentes SNPs e desta forma, rentabilizar a utilização de D_1 .

O *primer* universal desenvolvido é composto por 38 nucleótidos (nts), sendo que primeiros 20 nts são complementares à sequência de D_1 e os últimos 18 nts são complementares à sequência alvo, que se encontra imediatamente adjacente, em 5', à base que se pretende identificar. Através de uma reacção SBE, o ddNTP complementar à base que se encontra na posição avaliada é incorporado na extremidade 3'-OH do *primer* universal. Uma posterior hibridação deste com D_1 leva à aproximação entre o doador e o aceitante, permitindo que FRET ocorra e a consequente identificação do ddNTP incorporado. A representação esquemática desta reacção de SBE é apresentada na Figura 4.9.

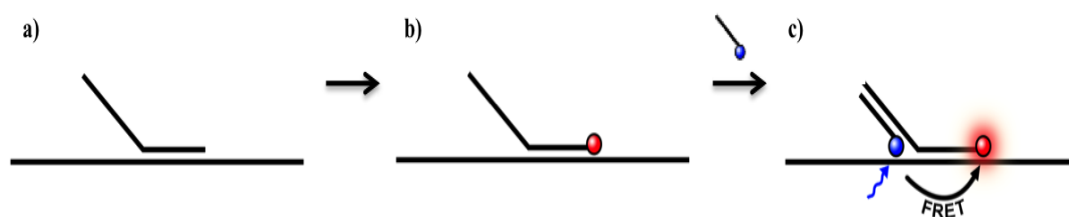


Figura 4.9. Representação esquemática da reacção de SBE utilizando um *primer* universal

A reacção de SBE inicia-se com a hibridação do *primer* universal ao *template* a ser analisado, b) seguindo-se a incorporação do respectivo ddNTP; c) A hibridação de D_1 com o *primer* universal permite a identificação do ddNTP incorporado

Os 18 nts da porção do *primer* universal que híbrida com o *template*, foram escolhidos de forma a minimizar a distância entre o doador e o aceitante (localizado no ddNTP) incorporado, sem que ocorra perda de especificidade para a região que se pretende que o *primer* hibride ⁹². Esta região foi escolhida de forma a que a sua *nearest neighbor melting temperature* (NN T_m) ⁹⁵ fosse o mais próxima de 74 °C, temperatura a que a *Thermosequenase*, enzima utilizada para a incorporação dos ddNTP nas reacções de SBE, apresenta maior actividade ⁵⁰.

Não sendo possível prever a existência de impedimentos estereoquímicos na hibridação de D_1 quando o *primer* universal se encontra ligado ao *template*, este foi desenhado de forma a NN T_m da porção que híbrida com o D_1 seja superior à NN T_m da porção que híbrida com o *template* de reacção. Assim sendo, os espectros de emissão podem ser traçados a uma temperatura em que o *primer* universal não se encontre hibridado com o *template*, mas que D_1 continue hibridado com o *primer* de SBE. Optou-se por utilizar a NN T_m , pois esta tem em consideração a sequência da cadeia de DNA ⁹⁵, ao contrário da temperatura de desnaturação básica que só considera o tamanho da cadeia e a composição em bases.

Na escolha dos últimos 18 nts, deverá ser considerado a percentagem de guanina e citosinas (%GC). Segundo a literatura, esta deverá ser superior a 40%, de forma a garantir o máximo de estabilidade a quando da hibridação ^{92, 96, 97, 98}. Este últimos 18 nts não deverão conter estruturas secundárias, uma vez que estas diminuem a eficiência de hibridação ^{99, 100} e, como tal, podem baixar a eficiência da reacção de SBE. Esta sequência não deverá apresentar auto-complementaridade, porque podem levar à formação de homodímeros, que diminuem a eficiência da polimerização de ddNTPs ^{99, 97}, pela diminuição do número de *primers* disponíveis para hibridar com o *template* de reacção. A estabilidade da extremidade 3'-OH é essencial para maximizar o rendimento da reacção de polimerização, assim como a diminuição de emparelhamento não desejados, pelo que a extremidade 3'-OH deverá ser formada por uma guanina ou por uma citosina ¹⁰¹.

Como prova de conceito, o *primer* de SBE foi desenhado de forma a que os últimos 18 nucleótidos (a secção do *primer* de SBE que híbrida com o *template*) sejam complementares a uma porção do exão 3 do gene C-MYC (código de acesso NCBI: [NM_002467.4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/NM_002467.4)). Apesar de esta região não conter um SNP com interesse clínico, permite que o *primer* universal desenvolvido respeite as condições acima descritas. As sequências passíveis de serem utilizadas como *primer* universal encontram-se apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Sequências possíveis para *primer* universal

Designação	Sequência (5' para 3')	NN Tm (°C)
1)	agcagacatgcgtggcccttaaggaaaacgattcctt	53,64
2)	agcagacatgcgtggcccttgcaacctcacaaccttg	60,62
3)	agcagacatgcgtggcccttgaactgtttcaaatg	51,65
4)	agcagacatgcgtggccctggaacgacgagaacagt	60,06
5)	agcagacatgcgtggccctgcatgataaatgcaacc	57,34
6)	agcagacatgcgtggcccttccttctaacagaaatg	51,67
7)	agcagacatgcgtggccctgaactgtttcaaatgca	54,20
8)	agcagacatgcgtggccctatgtcctgagcaatcacc	59,49
9)	agcagacatgcgtggccctggactgttgcggaaacg	62,14

Para a escolha do *primer* universal utilizado neste trabalho, apenas a sequência dos últimos 18 nts foi considerada, porque é esta a porção que irá funcionar como *primer* da reacção, e porque são estes que variam entre os diferentes *primers* desenhados. Uma análise detalhada destas sequências revelou que os *primers* 1), 2), 3), 5), 6) e 7) apresentavam auto-complementaridade, pelo que não serão considerados. O *primer* 1) para além de apresentar auto-complementaridade, apresenta também uma estrutura em *hairpin*. O *primer* 4) não foi considerado porque a sua extremidade 3'-OH é formada por uma timina e pretende-se que o último nucleótido tenha a capacidade de formar ligações triplas. O *primer* 8), apesar de respeitar todos os critérios descritos, apresenta uma NN Tm (59,49 °C) inferior à NN Tm do *primer* 9) (62,14 °C), que também respeita todos os critérios descritos. Assim sendo, o *primer* 9) foi o escolhido para a realização dos ensaios.

De forma a aumentar gradualmente a complexidade do sistema, foram desenhadas quatro sequências sintéticas (Univ-TLA, Univ-TLT, Univ-TLG, Univ-TLC - Tabela 3.2) contendo a sequência complementar aos últimos 18 nts do *primer* 9). Cada uma das sequências contém um dos quatros nucleótidos possíveis na posição adjacente à sequência de hibridação do *primer* universal, de forma a avaliar a resposta à incorporação de cada um dos 4 ddNTP marcados com diferentes aceitantes.

Um segundo *primer* universal foi desenhado para a detecção de SNP de interesse clínico (rs9939609) em produtos de PCR do gene FTO (código de acesso NCBI: [NT_010498.15](#)). O desenho deste segundo *primer* universal está constrangido, uma vez que os primeiros 20 nts têm de ser complementares à sequência de D₁ e os últimos 18 nts têm de ser complementares à sequência adjacente ao SNP a detectar, que é constante/fixa.

4.4. Reacções de SBE com *primer* universal em sequências de DNA sintético contendo uma porção do gene C-MYC

4.4.1. Reacção de SBE com um *template* de DNA sintético e respectivo ddNTP

Estas reacções têm com principal objectivo testar o *primer* universal, desenhado segundo os critérios descritos na Secção 4.1.

A confirmação da ocorrência de SBE foi realizada através da comparação da intensidade da banda de emissão do aceitante antes e depois da adição do doador. Assim, o espectro de emissão da reacção de SBE (com o *template* sintético Univ-TLT e na presença de ddA) foi traçado antes e após a adição de D₁. A banda do doador foi removida matematicamente destes espectros – Figura 4.10.

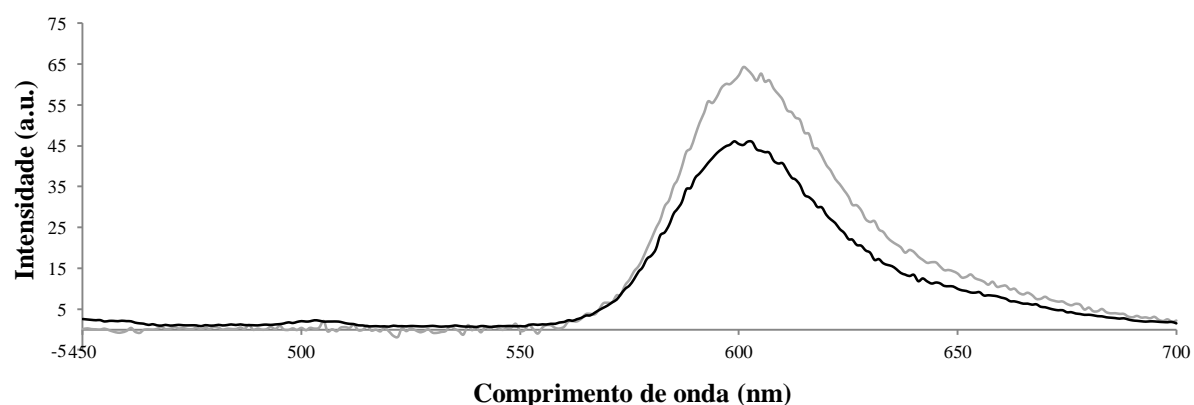


Figura 4.10. Espectros de emissão da reacção de SBE, e reacção de controlo, utilizando o *primer* universal com *template* TLT na presença de ddA

A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção de controlo (sem enzima). Em ambos os espectros, a banda de emissão do doador foi removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

Observa-se que a intensidade da banda de emissão de ddA (emissão a 600 nm) é superior após a adição de D₁. Tendo em conta que a concentração dos aceitantes é idêntica em ambos os casos e que, após a adição do doador, a emissão de ddA sofreu um acréscimo, pode considerar-se que este acréscimo se deve à ocorrência de transferência de energia entre o doador e o aceitante incorporado. Assim sendo, existem indícios que permitiram afirmar que reacção de SBE e a hibridação entre D₁ e o *primer* universal foram bem sucedidas. Isto porque, para que ocorra FRET neste sistema, é crucial que o ddNTP seja incorporado no *primer* universal e que ocorra a hibridação entre este e D₁.

Os espectros de emissão das reacções nos diferentes *templates* (Univ-TLA na presença de ddU, Univ-TLG na presença de ddC e Univ-TLC na presença de ddG) com a banda do doador removida matematicamente, são apresentadas nas Figuras D.5 I) , D.6 I), D.7 I) no anexo D. Em todos estes espectros é possível observar um acréscimo na banda de emissão do ddNTP em causa, após a adição de D₁, indicando por isso o sucesso da reacção de SBE nos diferentes *templates*. No entanto, é possível observar que este aumento de emissão não é igual para todos os pares, podendo isto dever-se a diferentes eficiências de transferência de energia (Φ_{Et}) nos diferentes pares doador/aceitante formados. Isto porque, o integral de sobreposição entre o espectro de emissão do doador com o espectro de absorção dos diferentes aceitantes é diferente para todos os pares ⁷⁶. Tendo em conta que a Φ_{Et} depende, entre outros factores, desta sobreposição espectral é expectável que o aumento na intensidade dos diferentes pares doador/aceitante seja diferente ⁶⁵.

Considerando que estes resultados indicam que ocorreu transferência de energia do doador para os aceitantes, estimou-se a Φ_{Et} para todos os pares (D₁ddA, D₁ddU, D₁ddC, D₁ddG – Figuras D.5 II) , D.6 II), D.7 II). Para tal, foi necessário quantificar o decréscimo de intensidade da banda de emissão do doador na reacção de SBE (onde ocorre FRET) em relação à reacção controlo, onde não existem ddNTPs marcados (ausência de FRET). Para o cálculo da eficiência de Φ_{Et} para o par D₁ddA foram traçados os espectros da reacção de SBE, utilizando o *primer* universal, o *template* Univ-TLT na presença de ddA - Figura 4.11.

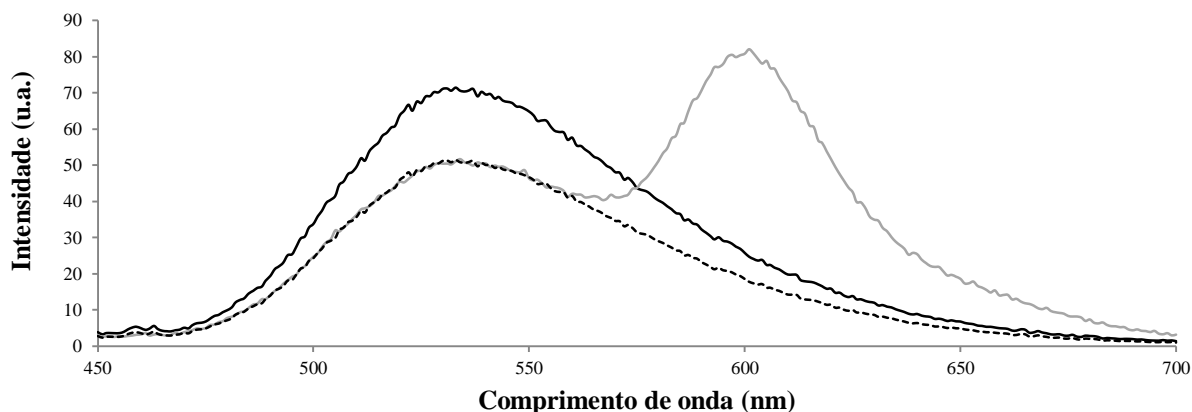


Figura 4.11. Espectros de emissão da reacção de SBE, utilizando o *primer* universal na presença de TLT e ddA para o cálculo de eficiência de transferência de energia

A linha a preto representa a banda de emissão do doador na ausência de aceitantes; a linha a cinzento representa reacção de SBE; a linha tracejada a preto representa o ajuste da banda de emissão doador na ausência de aceitantes à banda do doador na reacção de SBE. Espectros de emissão traçados utilizando condição 3, descrita na Tabela 3.8.

Para a quantificação do decréscimo da banda de emissão do doador, a quando da ocorrência de FRET, realizou-se o ajuste da banda de emissão do doador na ausência de aceitantes à banda de emissão do doador na reacção de SBE (linha tracejada a preto). Este ajuste foi realizado através da multiplicação de um coeficiente (a) ao espectro de emissão do doador. Através da variação deste coeficiente, foi possível obter um ajuste entre estas duas bandas de emissão.

Considerando que estes espectros de emissão foram traçados em estado estacionário, pela expressão $\% \Phi_{Et} = 100 \times (1 - a)$, foi possível calcular a eficiência de transferência de energia para cada par doador/aceitante. O coeficiente a corresponde a $\frac{F_{DA}}{F_D}$, onde F_D corresponde à emissão do doador na ausência de aceitante e F_{DA} corresponde à emissão do doador quando este transfere energia para o aceitante^{65, 102}. Esta expressão pode ser aplicada, uma vez que o doador se encontra à mesma concentração em ambas as situações.

No caso do par D₁ddA, o valor de a é de 0,7403, portanto $\Phi_{Et} = 25,97\%$. Para os pares D₁ddU ($a = 0,8585$), D₁ddC ($a = 0,8635$), D₁ddG ($a = 0,7358$), as Φ_{Et} são de 14,15%, 13,64%, 26,42%, respectivamente.

No entanto, estes valores de Φ_{Et} são o produto de duas eficiências: a eficiência de incorporação dos ddNTPs no *primer* universal SBE e a Φ_{Et} real. Desta forma, as Φ_{Et} calculadas são aparentes/relativas e podem não corresponder às reais. Recorrendo a medidas de fluorescência resolvida no tempo, os verdadeiros valores do rendimento de transferência de energia poderiam ser determinados⁶⁵.

Em suma, este conjunto de resultados demonstra que o *primer* universal desenvolvido permite a incorporação dos diferentes ddNTPs, permitindo também, a utilização do mesmo oligonucleótido marcado com doador (D₁) para a identificação do nucleótido incorporado no *primer* universal.

4.4.2. Reacção com *template* de DNA sintético na presença de dois ddNTP

Estas reacções foram realizadas de forma a verificar se o *primer* universal desenvolvido, pode ser utilizado na discriminação de genótipos homo- e heterozigóticos na presença de dois ddNTPs. Para estes ensaios optou-se por diminuir a concentração de aceitantes para metade (1 μ M) de forma a evitar que o ruído dos aceitantes não incorporados, dificultasse a avaliação directa do par doador/aceitante formado. Como *templates* foram escolhidos Univ-TLT e Univ-TLA (ver sequência na Tabela 3.2) para mimetizar genótipos homozigóticos (A/A ou T/T) e uma mistura equimolar destes *templates* foi utilizada para mimetizar o genótipo heterozigótico (A/T- em que cada *template* sintético representa um alelo). É de referir que a reacção que mimetiza um *template* heterozigoto, a concentração de cada *template* sintético foi reduzida para metade, em relação aos ensaios que mimetizam genótipos homozigótos.

Foram escolhidos estes *templates* e ddNTPs, pois representam o SNP a ser detectado nas amostras biológicas contendo o gene FTO, cujo SNP (rs9939609) presente na posição a ser avaliada pode conter uma timina ou uma adenina, e que serão apresentados na secção 4.6.

Na Figura 4.12 são apresentados os espectros de emissão das reacções de SBE nos diferentes *templates* e respectivos controlos, com a banda de emissão do doador removida.

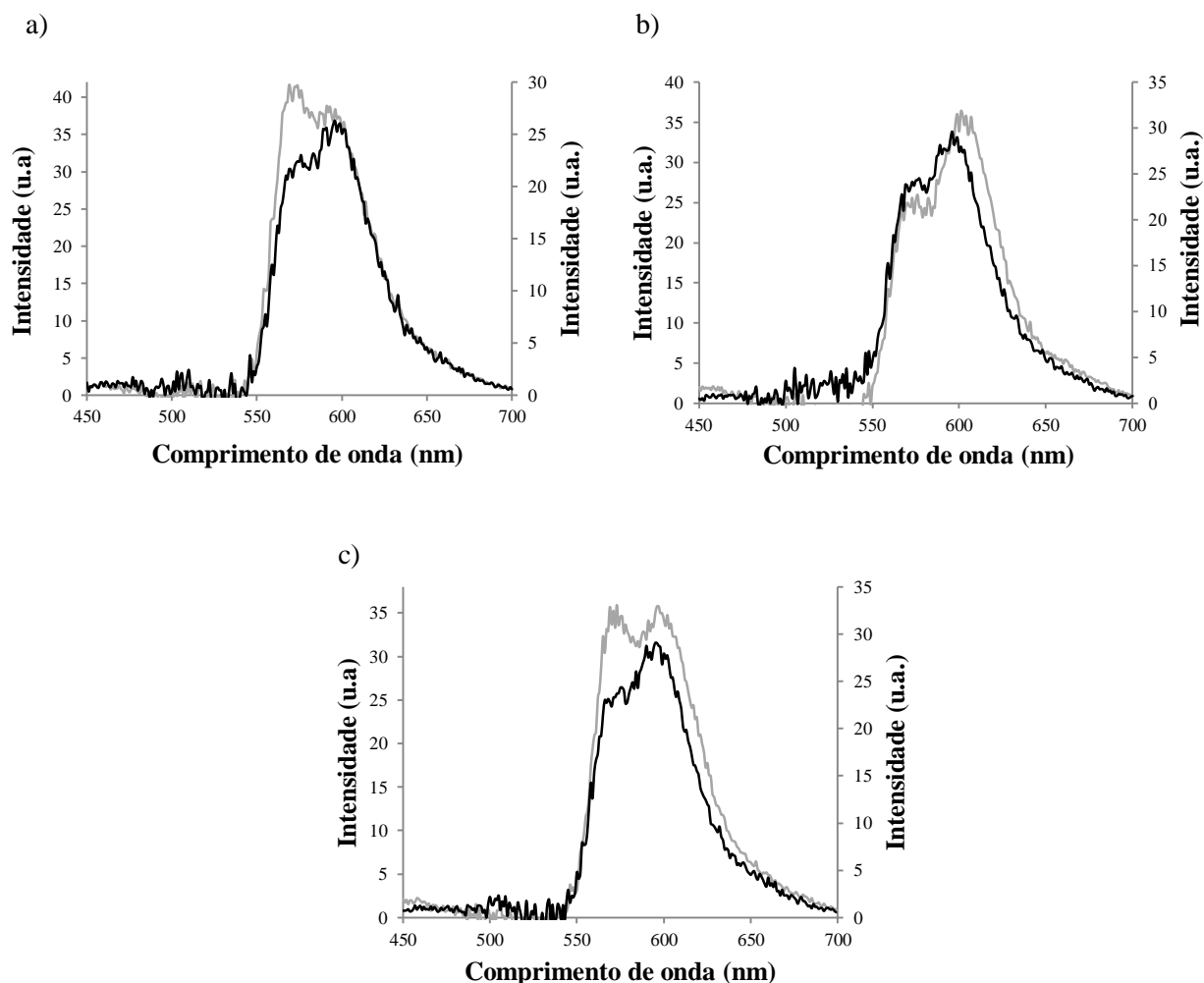


Figura 4.12. Espectros de emissão da reacção de SBE, e reacção controlo, utilizando o *primer* universal com diferentes *templates* na presença de ddA e ddU

a) Reacções com Univ-TLA; b) Reacções com Univ-TLT; c) Reacções com Univ-TLA e Univ-TLT

A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Nestes espectros, a banda de emissão do doador foi removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

Através da comparação entre os espectros de emissão das diferentes reacções apresentadas na Figura 4.12, verifica-se que o perfil dos espectros de emissão das reacções controlo é idêntico nas três reacções. No entanto, os espectros de emissão das reacções de SBE apresentam um perfil diferente em cada reacção, sendo observável um aumento de intensidade na banda de emissão do ddNTP complementar à base a ser questionada em cada reacção de SBE. Isto é um forte indício de que, nestas reacções, ocorreu a incorporação do ddNTP correcto no *primer* universal e que a hibridação deste com D_1 permite que ocorra FRET entre o doador (localizado em D_1) e o aceitante (incorporado no *primer* universal) permitindo a identificação das respectivas incorporações.

Estes resultados demonstram que este sistema de *primer* universal para codificação espectral permite, nestas condições, a discriminação da incorporação de ddNTPs específicos em meio homogéneo, isto é, sem ser necessário passos adicionais de purificação. Estes resultados também demonstraram a versatilidade do fenómeno de FRET para genótipagem.

4.4.3. Reacção de SBE com um *template* de DNA sintético e quatro ddNTP

Os resultados apresentados nesta secção têm como objectivo averiguar se a utilização do *primer* universal desenvolvido podia ser utilizado na presença de um *template* e dos 4 ddNTPs. Assim, a reacção de SBE foi realizada em Univ-TLT na presença dos 4 ddNTPs – Figura 4.13.

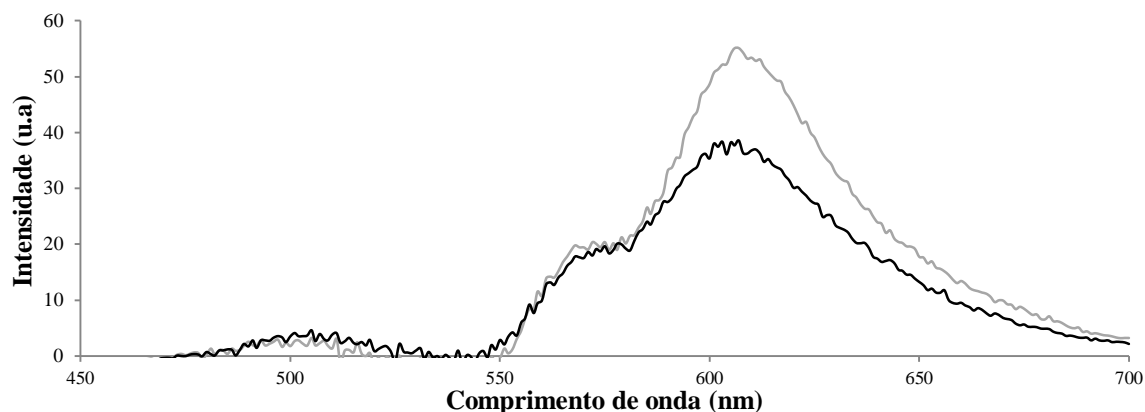


Figura 4.13. Espectros de emissão da reacção de SBE, e respectivo controlo, utilizando o *primer* universal com Univ-TLA e na presença de 4 ddNTPs

A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Nestes espectros, a banda de emissão do doador foi removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

Seria expectável um aumento na banda de emissão do aceitante ddA (600 nm) uma vez que este é o ddNTP complementar à base a ser questionada no *template*. Este aumento foi de facto observável mas, no entanto, constatou-se também um incremento na emissão em comprimentos de onda que correspondem à emissão de ddC (a 620 nm) e à emissão de ddG (a 650 nm). Este resultado não permitiu averiguar se este acréscimo, na emissão a 620 nm e a 650 nm, se deveu à incorporação inespecífica de ddC e de ddG ou ao aumento da banda de emissão de ddA. Isto significa que se a natureza do nucleótido que ocupa a posição avaliada (variante do SNP) não fosse conhecida, a determinação do par doador/aceitante formado não seria possível.

A precipitação destas reacções (SBE e controlo) foram realizadas de forma a remover os ddNTPs não incorporados e assim verificar qual o ddNTP incorporado no *primer* universal – Figura 4.14.

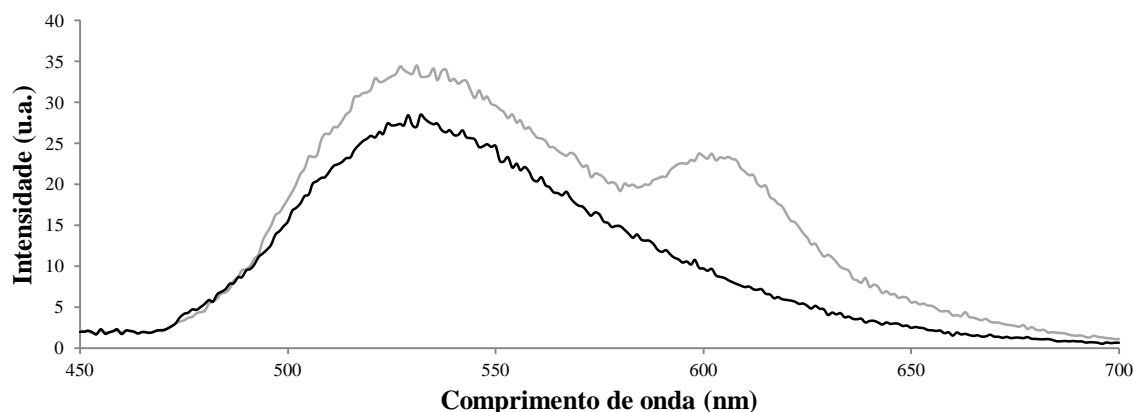


Figura 4.14. Espectros de emissão da precipitação da reacção de SBE e respectivo controlo, utilizando o *primer* universal com Univ-TLA na presença de 4 ddNTPs. A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Espectros de emissão traçados utilizando condição 3, descrita na Tabela 3.8.

Nesta figura, observa-se a banda de emissão de ddA (600 nm) na reacção de SBE. Isto demonstra que a incorporação de ddA no *primer* universal ocorreu com sucesso. Desta forma, é possível inferir que o aumento na emissão a 620 nm e a 650 nm (antes da precipitação – Figura 4.12) se deve, provavelmente, ao aumento de intensidade da banda de emissão de ddA.

Realizou-se também a reacção de SBE na presença de Univ-TLC e dos 4 ddNTPs. O espectro de emissão, com a banda do doador removida, é apresentada na Figura D.8. I) no anexo D. Os espectros de emissão da reacção de SBE são semelhantes aos obtidos para a reacção realizada em Univ-TLA, uma vez que é possível observar um aumento na emissão a 600 nm (se bem que este aumento é muito menor ao observado na Figura 4.12) e a 650 nm (banda de emissão de ddG – ddNTP a ser incorporado no *primer* universal).

O espectro de emissão da reacção de SBE após precipitação – Figura D.8 II) no anexo D – revela a presença da banda de emissão do doador (a 530 nm) e de ddG (a 650 nm), banda esta que se encontra ausente da reacção controlo. Apesar do sucesso da incorporação de ddG no *primer* universal, não foi possível determinar o par doador/aceitante formado em solução antes de se recorrer à purificação desta reacção. O facto de duas reacções de SBE realizadas em *template* diferentes, resultarem num espectro de emissão semelhante, demonstra a dificuldade da caracterização espectral quando em solução estão presentes os 4 ddNTPs.

Apesar da precipitação das reacções de SBE permitirem a identificação de qual o ddNTP incorporado (por remoção dos ddNTP não incorporados), pretende-se desenvolver um sistema de codificação espectral em meio homogéneo, eliminando passos de precipitação. Caso contrário a codificação espectral seria redundante, deixando por isso de ser necessário a utilização de um doador, pois a utilização de um ddNTP marcado com um fluoróforo seria o suficiente para a identificação da base que ocupa a posição a ser analisada.

Em suma, a discriminação da incorporação de um ddNTP no *primer* universal desenvolvido, a quando da presença dos 4 ddNTPs, ainda requer a optimização das condições de reacção de forma a que seja possível a detecção de qual o par doador/aceitante formado em solução.

Apesar das reacções utilizando o *primer* universal na presença dos 4 ddNTPs não permitirem a identificação do ddNTP incorporado no *primer*, os resultados apresentados na secção 4.4.2 demonstraram que esta detecção foi possível, utilizando dois ddNTPs. Como tal, prosseguiu-se os estudos utilizando produtos de PCR do gene C-MYC.

4.5 Reacções de SBE com *primer* universal em alvos correspondentes a produtos de PCR de C-MYC

Com o conjunto de resultados seguintes, pretende-se demonstrar a hibridação entre D₁ e o *primer* universal após incorporação de ddA.

4.5.1. Perfil de desnaturação de reacção de SBE em produto de PCR do gene C-MYC na presença de ddATP

Nesta secção, a hibridação de D₁ com o *primer* universal é demonstrada através do perfil de desnaturação, seguido por fluorescência. Para tal, realizaram-se as reacções de SBE usando como *template*, o produto de PCR obtido de acordo com o descrito secção 3.2.5.2 (ver Figura C.1 no anexo C), e na presença de ddA –Figura 4.15.

Considerando que esta mistura reaccional, após a adição de D₁, não foi sujeita ao programa de ciclos térmicos descrito na Tabela 3.11, pode considerar-se que no início da medição do perfil de desnaturação D₁ e o *primer* universal não se encontravam hibridados.

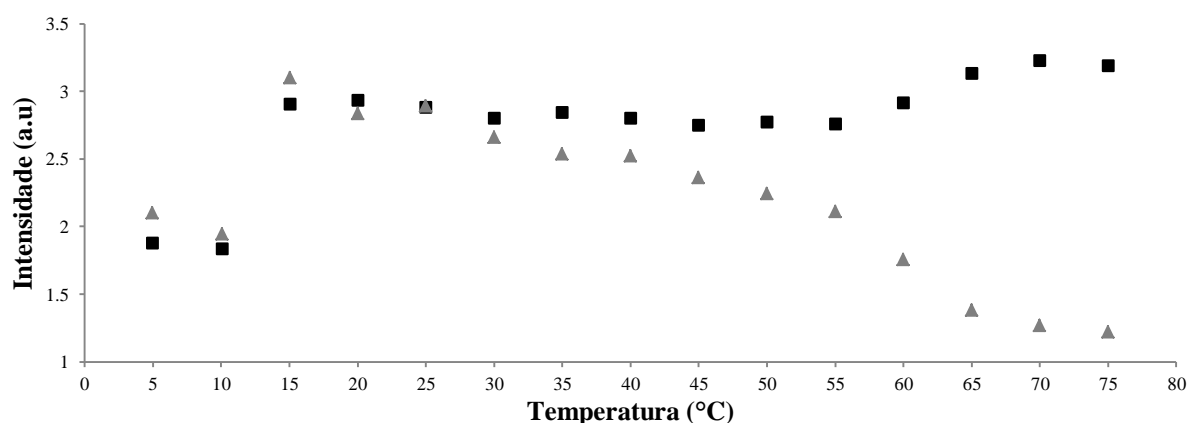


Figura 4.15. Perfil de desnaturação entre D₁ e o *primer* universal com ddA incorporado. Os quadrados a preto representam a emissão a 600 nm (aceitante); Os triângulos a cinzento representam a emissão a 530 nm (doador). Espectros de emissão traçados utilizando a condição 4, descrita na Tabela 3.8.

Nesta figura, é possível observar que a 55 °C ocorreu um acréscimo acentuado da emissão do aceitante a 600 nm e um decréscimo acentuado da emissão do doador a 530nm, constituindo um indicativo de que a hibridação entre D₁ e o *primer* universal começa a tornar-se relevante perto da temperatura de *melting* dos últimos 18 nts (62,14 °C) do *primer* universal, porção responsável pela hibridação com o *template* de reacção. Considerando que esta variação nas emissões do aceitante e doador só ocorrem perto da temperatura de desnaturação entre o *primer* universal e o *template*, é indicativo que a hibridação entre estes representa um impedimento estereoquímico que dificulta a hibridação de D₁ com o *primer* universal (isto quando as amostras não são sujeitas ao programa de hibridação descrito na Tabela 3.11).

De forma a confirmar que o perfil de desnaturação obtido na Figura 4.15 é o resultado da hibridação entre o *primer* universal e D₁, foram realizados diferentes controlos de forma independente, nomeadamente: reacção sem enzima - Figura 4.16 a) ; doador e aceitante isolados – Figura 4.16 b) ; reacção em *template* não complementar com enzima – Figura 4.16 c) ; reacção em *template* não complementar sem enzima – Figura 4.16 d).

Através destas reacções é possível determinar como a emissão do doador e do aceitante varia em função da temperatura (Figura 4.16 b) e em situações em que não ocorreu a incorporação de ddA no *primer* universal (Figura 4.16 a), c) e d)). Ou seja, possibilitando a avaliar qual a variação de emissão dos fluoróforos em função da temperatura, numa situação em que não ocorreu FRET entre os fluoróforos utilizados.

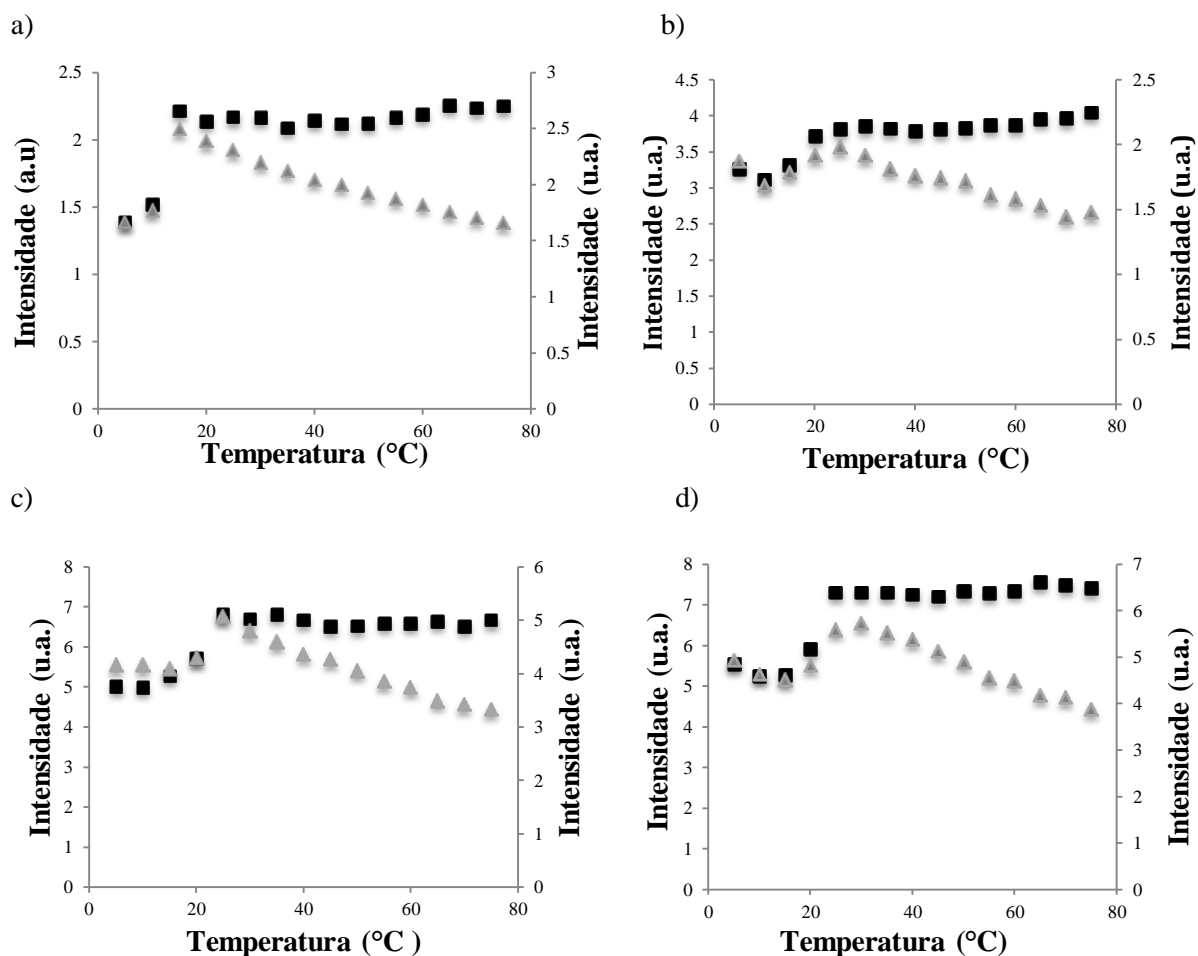


Figura 4.16. Perfil de desnaturação dos diferentes controlos

a) Reacção em produto PCR C-MYC na ausência de enzima; b) Doador e aceitante nas condições de reacção; c) Reacção em *template* não complementar ao *primer* universal na presença de enzima; d) Reacção em *template* não complementar ao *primer* universal na ausência de enzima. Os quadrados a preto representam a emissão de ddA a 600 nm; os triângulos a cinzento representam a emissão do doador a 530 nm. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 4, descrita na Tabela 3.8.

Através da análise da Figura 4.16 verifica-se que a variação na emissão do doador e do aceitante é praticamente idêntica, não sendo observável nenhuma variação significativa na emissão destes fluoróforos a 55 °C. Tal indica que na reacção de SBE, representada na Figura 4.15, ocorreu a incorporação de ddA no *primer* universal e que a hibridação deste com D₁ é responsável pelo decréscimo acentuado na emissão do doador (530 nm) e pelo aumento acentuado na emissão do aceitante (600 nm).

É de referir que os perfis de desnaturação representados nas Figuras 4.15 e 4.16, apresentam um incremento na emissão do doador e do aceitante dos 5 °C aos ~20 °C. Este aumento ocorre devido à diminuição de condensação de água nas células de quartzo utilizadas nestas medições.

4.5.2. Hibridação ao longo do tempo de D₁ com *primer* universal após reacção de SBE na presença de ddA

A presente secção tem como principal objectivo reforçar a ocorrência de hibridação entre D₁ e o *primer* universal, seguindo a hibridação ao longo do tempo.

Para tal, realizou-se uma reacção de SBE na presença de ddA e de Uni-TLT e os espectros de emissão foram registados imediatamente a seguir à adição de D₁ e ao longo de 60 minutos. Estes espectros de emissão foram traçados a 20 °C e a 64 °C, de forma a avaliar o efeito da temperatura na hibridação de D₁ com o *primer* universal. Para monitorizar esta hibridação, seguiu-se a intensidade de fluorescência calculando as áreas das banda de emissão de ddA e do doador para cada tempo de medição – Figura 4.17 a) e b).

Escolheu-se a temperatura de medição de 20 °C, pois esta garante que o *primer* universal se encontrava hibridado ao *template*. A temperatura de 64 °C foi escolhida, pois o perfil de desnaturação apresentado na secção anterior demonstra que a esta temperatura a hibridação de D₁ com o *primer* universal se tornara relevante.

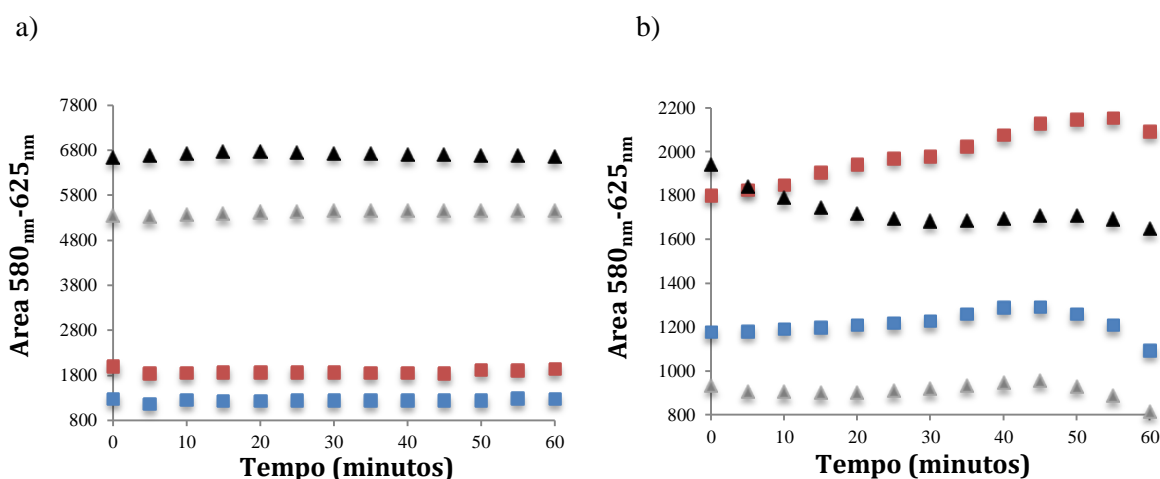


Figura 4.17. Representação da área da banda de emissão de ddA em função do tempo, após adição de D₁

a) Medição a 20 °C ; b) Medição a 64 °C

Os quadrados a vermelho representam a área da banda de emissão de ddA na reacção de SBE, os quadrados a azul representam a área da banda de emissão de ddA na reacção controlo (sem enzima) ; Os triângulos a preto representam a área de emissão do doador na reacção de SBE; Os triângulos a cinzento representam a área da banda de emissão do doador na reacção controlo. Espectros de emissão traçados utilizando, a) condição 5, b) condição 6, descritas na Tabela 3.8.

Pela Figura 4.17 a) verifica-se, tanto na reacção de SBE como na reacção controlo, que a intensidade de emissão de ddA não sofreu um aumento, sendo que o seu valor foi praticamente constante ao longo do tempo. Isto significa que quando os espectros são traçados a 20 °C (sem que a amostra seja sujeita ao programa de hibridação descrito na Tabela 3.11) a hibridação entre D₁ e o *primer* universal ou não ocorre, devido a impedimentos estereoquímicos, ou demora mais que do que os 60 minutos em que se esteve a seguir a hibridação.

Já na Figura 4.17 b) verifica-se que na reacção de SBE, a emissão de ddA aumentou ao longo do tempo, enquanto a emissão do doador sofreu um decréscimo acentuado nos primeiros 25 minutos.

No entanto, na reacção controlo, verifica-se que o valor da intensidade de emissão de ddA e do doador se mantiveram praticamente constante ao longo do tempo.

Considerando que a 64 °C observa-se um acréscimo na emissão do aceitante e um decréscimo na emissão do doador (o que não é observado na reacção controlo), constitui um indicativo que a hibridação entre D₁ com o *primer* universal estava a ocorrer, provavelmente pela libertação do impedimento estereoquímico aquando da desnaturação da porção do *primer* universal que se encontrava hibridada com o *template* de reacção.

É de referir que o valor absoluto das áreas de emissão a 64 °C sofreu um decréscimo comparativamente às áreas obtidas a 20 °C. Isto ocorreu, porque a temperaturas elevadas os decaimentos não radiativo, do estado excitado para o estado fundamental, tornam-se mais predominantes do que a temperaturas mais baixas^{65, 103}.

Considerando os resultados apresentados nesta secção e na secção anterior, indicam que o aumento da intensidade da banda de emissão do ddNTP incorporado ocorre devido à hibridação entre D₁ e o *primer* universal e, portanto, devido à ocorrência de FRET entre o doador e o aceitante, prosseguiu-se o estudo utilizando produtos de PCR de amostras biológicas contendo SNP de interesse clínico (rs9939609).

4.6. Reacções de SBE com *primer* universal em produtos de PCR de FTO

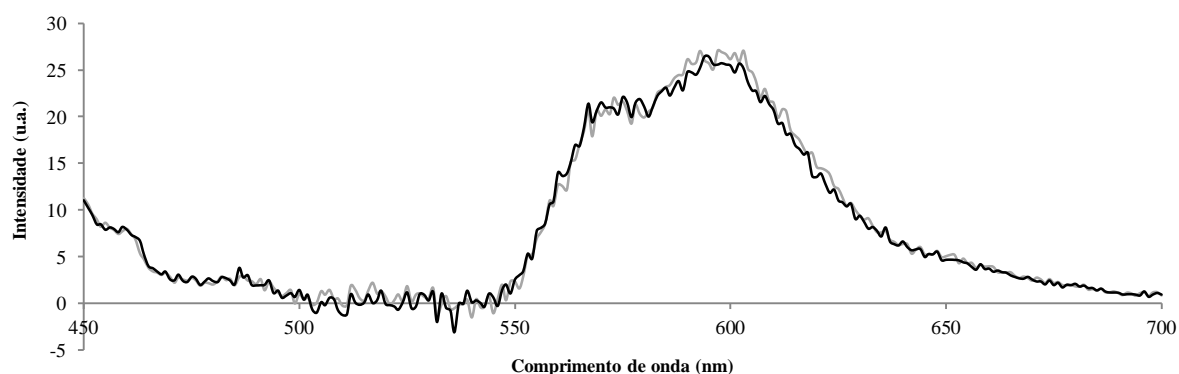
Considerando que os resultados apresentados até à presente secção foram obtidos utilizando um *primer* universal desenhado em condições que maximizassem a eficiência da reacção (ver secção 4.1), esta secção teve como objectivo averiguar se este sistema poderia ser utilizado para a detecção de um SNP com interesse clínico, o SNP (rs9939609) envolvido na predisposição à obesidade localizado no gene FTO⁸⁷.

Para tal, utilizaram-se produtos de PCR de seis amostras biológicas – seis indivíduos diferentes- (ver Figura C.2 no anexo C), contendo o SNP de interesse. É de referir que estes produtos de PCR (ver sequência do fragmento em A.3 do anexo A) contêm ambos os alelos. Na Tabela 4.2 é apresentado o genótipo das posições avaliadas nas diferentes amostras.

Tabela 4.2. Genótipo das amostras biológicas utilizadas como *templates* nas reacções de SBE

Amostra	Genótipo
1	T/T
2	A/A
3	A/T
4	A/T
5	T/T
6	T/T

O *primer* universal utilizado nestes ensaios foi desenhado de forma a hibridar na cadeia -, pelo que o ddNTP a ser incorporado no *primer* universal é o mesmo que compõe o genótipo de cada amostra (cadeia +). Considerando que o SNP em causa pode ser composto por uma adenina ou por uma timina, realizou-se a reacção de SBE nestes produtos de PCR na presença de ddA e de ddU. Numa primeira abordagem, optou-se por realizar a reacção de SBE no *template* 2 não purificado. Os espectros de emissão desta reacção são apresentados na Figura 4.18.

**Figura 4.18.** Espectros de emissão da reacção de SBE, e reacção controlo, utilizando o *primer* universal com produto de PCR da amostra 2

A linha a cinzento representa reacção de SBE; a linha preto representa a reacção controlo. Nestes espectros, a banda de emissão do doador foi removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

Nesta figura verifica-se que os espectros de emissão da reacção de SBE e da reacção controlo são completamente sobreponíveis, indicando por isso que não é possível identificar o par doador/aceitante formado em solução. Tal significa que a incorporação do respectivo ddNTP não ocorreu ou a sua eficiência foi demasiado baixa. O facto do *template* não ter sido purificado pode ter contribuído para a diminuição da eficiência da reacção de SBE. Isto porque, os dNTPs utilizados na reacção de PCR (a uma concentração de 200 μ M) poderão ter impossibilitado a incorporação do ddNTP (que se encontravam a uma concentração de 2 μ M na reacção de SBE) ⁶¹. Assim sendo, optou-se por purificar os produtos de PCR através da extracção da respectiva banda do gel de agarose,

seguindo o procedimento descrito na secção 3.2.6.3 (ver Figura C.3 no anexo C), de forma a ser possível separar os *templates* de reacção das componentes da reacção de PCR.

Na Figura 4.19 é apresentado um gráfico que resume os resultados obtidos. Os espectros de emissão de cada reacção é apresentado nas Figuras D.9 e D.10 no anexo D.

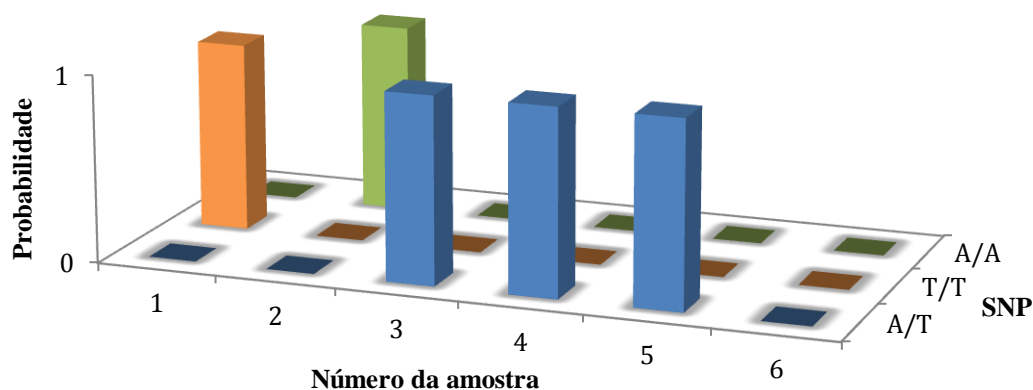


Figura 4.19. Representação esquemática dos resultados obtidos através da genótipagem do SNP rs9939609 nos produtos de PCR de amostras biológicas, utilizando o sistema de *primer* universal. As barras a azul representam genótipos A/T; A barra a laranja representa o genótipo T/T; A barra a verde representa o genótipo A/A.

Pela Figura 4.19 verifica-se que três das amostras analisadas apresentam o genótipo A/T. Uma apresenta um genótipo T/T e a outra apresenta o genótipo A/A. A comparação entre estes resultados e com os resultados de sequenciação revela, que as amostras 1, 2, 3 e 4 apresentam o genótipo correcto (os espectros destas reacções são apresentados na Figuras D.9 I), II), III) e Figura D.10 I) no anexo D, respectivamente). Os ensaios realizados nas amostras 1, 2 e 3 foram feitos em triplicado, de forma independente, sendo observado uma variação nas intensidades de emissão de cerca de 20 % para a emissão de ddU e uma variação de 18 % para a emissão de ddA.

Os espectros de emissão da reacção de SBE na amostra 5 (Figura D.10 II) no anexo D) apresenta um acréscimo nas bandas de emissão de ambos os ddNTPs em solução, indicando que se trata de um genótipo heterozigótico. No entanto, os resultados de sequenciação demonstram que esta amostra é homozigótica (T/T) para a posição avaliada. Considerando que ao longo deste trabalho não se observou a incorporação inespecífica dos ddNTPs presentes em solução, isto é um indicativo que pode ter ocorrido a contaminação deste *template* durante o processo de extracção da banda do gel de agarose.

Não foi possível determinar o genótipo da amostra 6, uma vez que o espectro de emissão da reacção de SBE é idêntico ao da reacção controlo (Figura D.10 III) no anexo D), indicando por isso que não ocorreu a incorporação do respectivo ddNTP no *primer* universal. Assim sendo, não foi possível determinar todos os genótipos correctamente nas amostras biológicas utilizadas.

Estes resultados indicam o sistema de *primer* universal para codificação espectral desenvolvido ainda requer optimizações que visem o aumento do rendimento da reacção, de forma a ser possível a identificação inequívoca do par doador/aceitante formado como resultado da reacção de SBE.

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

Neste trabalho procurou-se desenvolver um desenho experimental, adequado ao método de codificação espectral, que permitisse a utilização do mesmo oligonucleótido marcado com doador para a análise de diferentes SNPs – *primer* universal.

Verificou-se que a utilização de D_1 como *primer* de SBE possibilitou observar um aumento na emissão dos ddNTPs aquando da sua incorporação em D_1 , indicando a ocorrência de FRET entre D_1 e os aceitantes, utilizando o *template* complementar ao ddNTP em solução. A confirmação da incorporação dos ddNTPs foi realizada através da precipitação dos produtos de SBE. O resultado da precipitação indicou que a incorporação de ddA e de ddG foi melhor sucedida que a incorporação de ddU e de ddC. Desta forma prosseguiram-se os estudos utilizando ddA e ddG e respectivos *templates* (TLC e TLT). A aplicação deste sistema na análise de dois *loci* também foi possível, na medida em que permitiu a discriminação da incorporação de dois ddNTPs (ddA, ddG), na presença de dois *templates* sintéticos (TLT, TLC) mimetizando a presença de dois alelos. A utilização de um *template* na presença dos 4 ddNTPs, não permitiu a identificação do ddNTP incorporado, apesar da precipitação desta reacção demonstrar que ocorreu a incorporação do ddNTP correcto em D_1 . No entanto, o aumento da quantidade de enzima por reacção permitiu a identificação do par doador/aceitante quando esta reacção foi realizada com 2 *templates* e 4 ddNTPs, através do aumento na intensidade de emissão dos ddNTPs complementares à posição avaliada, sendo o sucesso da incorporação dos ddNTPs observável através da precipitação destas reacções.

Uma vez demonstrado que a utilização de D_1 permite a transferência de energia entre o doador e os aceitantes utilizados (presente nos ddNTPs), procedeu-se ao desenvolvimento do *primer* universal para codificação espectral. A utilização deste *primer* universal como *primer* de SBE demonstrou que este permite a incorporação dos ddNTPs, quando na reacção estava presente 1 dos ddNTPs e o seu respectivo *template*. Isto porque que após a hibridação entre D_1 e o *primer* universal, foi possível observar um acréscimo na emissão do ddNTP incorporado. Estimou-se a eficiência de transferência de energia para os pares D_1 ddA, D_1 ddU, D_1 ddC, D_1 ddG, como sendo de 25,97%, 14,15%, 13,64%, 26,42%, respectivamente. No entanto, dado estes valores de eficiência de transferência de energia se encontrarem afectados pela eficiência de incorporação dos diferentes ddNTPs no *primer* universal e pela eficiência de hibridação entre D_1 e o *primer* universal, as eficiências de transferência de energia calculadas são aparentes. A utilização do *primer* universal na presença de dois ddNTPs e de um ou dois *templates*, demonstrou que o *primer* universal desenvolvido permite a diferenciação entre *templates* que mimetizam génotipos homo- e heterozigotos, uma vez que, em cada uma destas reacções observou-se um aumento na intensidade de emissão do ddNTP complementar ao nucleótido presente na posição avaliada no *template* sintético.

A aplicação deste *primer* na presença de um *template* e dos 4 ddNTPs, não permitiu a identificação clara do par doador/aceitante formado, uma vez que se observou um acréscimo na emissão a comprimentos de onda que correspondem à emissão dos ddNTPs que não deveriam ser incorporados, tendo em conta a natureza do *template* presente em solução. A precipitação destas

reações demonstrou que não ocorreu incorporação inespecífica de ddNTPs no *primer*, mas sim o aumento da banda de emissão do ddNTP que foi incorporado.

A hibridação entre D_1 e o *primer* universal foi demonstrada em produtos de PCR do gene C-MYC, através do perfil de desnaturação (seguido por fluorescência) e através de medições dos espectros de emissão, ao longo de 1 hora, após a adição de D_1 .

Considerando que este sistema de *primer* universal permitiu a diferenciação entre *templates* que mimetizavam genótipos homo- e heterozigotos, procedeu-se à aplicação deste sistema de *primer* universal em produtos de PCR de amostras biológicas, contendo um SNP de interesse clínico. Estas reações foram realizadas na presença de 2 ddNTPs complementares aos nucleótidos que correspondem às variantes alélicas deste SNP.

Foram testadas 6 amostras biológicas, cujo genótipo foi determinado por sequenciação. Verificou-se que o sistema desenvolvido permitiu a discriminação correcta em 4 das amostras testadas. Uma das amostras testadas resultou num genótipo incorrecto, e na outra amostra não foi possível determinar qual o genótipo, uma vez que o espectro de emissão da reacção de SBE, sendo idêntico ao da reacção controlo, não permitiu assegurar a ocorrência de reacção.

Desta forma, torna-se claro que o sistema desenvolvido ainda necessita de optimização. É necessário determinar o limite de detecção do sistema, isto é, a quantidade mínima de *template* no qual é possível realizar a reacção de SBE. Para além do limite de detecção do sistema é necessário verificar como é que os sinais de fluorescência variam em função da concentração do *template* utilizado na reacção.

Considerando que a concentração de *primer* universal foi mantida constante ao longo deste trabalho, seria importante avaliar como a variação da concentração deste poderia melhorar os sinais obtidos. É também importante determinar qual o melhor rácio de D_1 /*primer* universal que permite a obtenção de sinais de FRET mais claros. O programa de ciclos térmicos utilizados para a reacção de SBE também necessita de optimizações, de forma a permitir uma maior eficiência de SBE.

Após total optimização da metodologia apresentada, pretende-se aumentar a complexidade e avançar para a determinação simultânea de 2 SNPs distintos numa mesma amostra, utilizando mais um oligonucleótido marcado com um doador diferente ao utilizado neste trabalho (D_2) e mais um *primer* universal de SBE especificamente desenhado. A utilização de dois doadores na mesma reacção permite aumentar a capacidade de *multiplex* deste sistema, aplicando-se o modelo de codificação espectral desenvolvido por Giestas *et al.*

A validação do sistema desenvolvido terá de ser realizada num número de amostras biológicas muito superior ao utilizado, de forma a que a validação seja estatisticamente relevante. Esta validação irá permitir a obtenção da frequência de falsos positivos/negativos, que é crucial para o desenvolvimento de uma nova metodologia de genotipagem.

6. Bibliografia

1. Lander E. S., Initial impact of the sequencing of the human genome, *Nature*, 470, 187–197 (2011).
2. International Human Genome Sequencing Consortium, Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431, 931–945 (2004).
3. Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., et al., The sequence of the human genome, *Science*, 291, 1304–1351 (2001).
4. He Y.-S., Zhang W., Yang Z. Q., Structural variation in the human genome, *Nature Reviews Genetics* 31, 771–778 (2009).
5. The 1000 Genomes Project Consortium, A map of human genome variation from population-scale sequencing, *Nature*, 467, 1061–1073 (2010).
6. Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S. C., *et al.*, A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature*, 409, 928–933 (2001).
7. Brookes A., The essence of SNPs, *Gene*, 234, 177–186 (1999).
8. Syvänen A., Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms, *Nature Reviews Genetics*, 2, 930–942 (2001).
9. Giacomini K. M., Brett C., Altman R., *et al.*, The pharmacogenetics research network: from SNP discovery to clinical drug response, *Clin Pharmacol Ther*, 81, 328–345 (2007).
10. Faber A., Ferreira G., Silva S., Rueff, J., Gaspar J., Multiplex PCR-single-base extension genotyping of multiple glutathione S-transferase polymorphisms, *Biotechnol Appl Bioc*, 41, 9–15 (2005).
11. Guo Y., & Jamison D. C., The distribution of SNPs in human gene regulatory regions, *BMC genomics*, 6, 140–151 (2005).
12. The International HapMap Consortium, A haplotype map of the human genome, *Nature*, 437, 1299–1320 (2005).
13. The International HapMap Consortium, A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs, *Nature*, 449, 851–861 (2007).
14. Nowotny P., Kwon J., Goate A., SNP analysis to dissect human traits, *Curr Opin Neurobiol*, 11, 637–641 (2001).
15. Kwok P., Methods For Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms, *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2, 235–258 (2001).
16. Shi M., Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies, *Clin Chem*, 47, 164–172 (2001).
17. Twyman R., Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Techniques—An Overview, *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, 1202–1207 (2005).

18. Botstein D., White R., Skolnick M., Davis, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am J Hum Genet*, 32, 314–331 (1980).
19. Chuang L.-Y., Yang C.-H., Tsui K.-H., *et al.*, Restriction enzyme mining for SNPs in genomes, *Anticancer Res*, 28, 2001–2007 (2008).
20. Nathans D., Smith H., Restriction Endonucleases In The Analysis And Restructuring Of DNA Molecules, *Annu Rev Biochem*, 273–293 (1975).
21. Kim S., Misra A., SNP genotyping: technologies and biomedical applications, *Annu Rev Biomed Eng*, 9, 289–320 (2007).
22. Lyamichev V., Mast A., Hall J., *et al.*, Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnol*, 17, 292–296 (1999).
23. Liu Y., Kao H.-I., Bambara R., Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*, 73, 589–615 (2004).
24. Olivier M., The invader assay for SNP genotyping, *Mutat Res-Fund Mol M*, 573, 103–110 (2009).
25. Hall J. G., Eis P., Law S., *et al.*, Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction, *P Natl Acad Sci USA*, 97, 8272–8277 (2000).
26. Weiner M. P., Genetic Variation: A Laboratory Manual, 161 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007).
27. Trapp C., Schenkelberger M., Ott A., Stability of double-stranded oligonucleotide DNA with a bulged loop: a microarray study, *BMC biophysics*, 4, 20-33 (2011).
28. Conner B., Reyes A., Morin C., *et al.*, Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides, *P Natl Acad Sci USA*, 80, 278–282 (1983).
29. Urakawa H., Fantroussi E. S., Smidt H., *et al.*, Optimization of Single-Base-Pair Mismatch Discrimination in Oligonucleotide Microarrays, *Appl Environ Microb*, 69, 2848–2856 (2003).
30. Szostak J.W., Stiles J.I., Tye B.K., Chiu P., Sherman F., Hybridization with synthetic oligonucleotides. *Method Enzymol*, 68, 419–428 (1979).
31. Naiser T., Kayser J., Mai T., Michel W., Ott A., Position dependent mismatch discrimination on DNA microarrays - experiments and model, *BMC bioinformatics*, 9, 509–516 (2008).
32. Lucarelli F., Marrazza G. Mascini M., Design of an optimal allele-specific oligonucleotide probe for the efficient discrimination of a thermodynamically stable (G x T) mismatch. *Anal Chim Acta*, 603, 82–86 (2007).
33. Syvänen A.-C., Toward genome-wide SNP genotyping, *Nat Genet*, 37 Suppl, S5–10 (2005).
34. Edenberg H. J., Liu Y., Laboratory methods for high-throughput genotyping, *Cold Spring Harbor protocols*, 183–193 (2009)

35. Gibbs R., Nguyen P.-N., Caskey T., Detection of single DNA base differences by competitive oligonucleotide priming, *Nucleic Acids Res*, 17, 2437–2448 (1989).
36. Patrinos G. P., Ansorge W. J., *Molecular Diagnostics*. (Academic Press: 2010).
37. Newton C., Graham A., Heptinstall L., *et al.*, Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS), *Nucleic Acids Res*, 17, 2503–2516 (1989).
38. Landegren U., Kaiser R., Sanders J., Hood L., A ligase-mediated gene detection technique, *Science*, 1077–1180 (1988).
39. Jarvius J., Nilsson M., Landegren U., Oligonucleotide ligation assay, *Methods in Molecular Biology* 215–228 (2003).
40. Barany F., Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase, *P Natl Acad Sci USA*, 88, 189–193 (1991).
41. Samiotaki M., Kwiatkowski M., Parik J., Landegren U., Dual-Color Detection of DNA Sequence Variants by Ligase-Mediated Analysis, *Genomics*, 20, 238–242.
42. Grossman P. D., Bloch W., Brinson E., *et al.*, High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation, *Nucleic Acids Res*, 22, 4527–4534 (1994).
43. Day N. S., Tadin M., Christiano A., *et al.*, Rapid prenatal diagnosis of sickle cell diseases using oligonucleotide ligation assay coupled with laser-induced capillary fluorescence detection, *Prenatal Diag*, 22, 686–691 (2002).
44. Deng J.-Y., Zhang X., Mang Y., *et al.*, Oligonucleotide ligation assay -based DNA chip for multiplex detection of single nucleotide polymorphism, *Biosens Bioelectron*, 19, 1277–1283 (2004).
45. Syvänen A.-C., Aalto-Setälä K., Harjua L., Kontula K., Söderlund H., A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E, *Genomics*, 8, 684–692 (1990).
46. Kuppaswamy M. N., Hoffman J., Kasper C., *et al.*, Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes, *P Natl Acad Sci USA*, 88, 1143–1147 (1991).
47. Haff L., Smirnov I. P., Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry, *Genome Res*, 7, 378–388 (1997).
48. Di Gusto D., King G., Single base extension (SBE) with proofreading polymerases and phosphorothioate primers: improved fidelity in single-substrate assays, *Nucleic Acids Res*, 31, 7e (2003).
49. Arezi B., Efficient and High Fidelity Incorporation of Dye-terminators by a Novel Archaeal DNA Polymerase Mutant, *J Mol Biol*, 322, 719–729 (2002).

50. Horn P., Davis M., Cunniff J., *et al.*, Thermo SequenaseTM DNA Polymerase and T. acidophilum Pyrophosphatase: New Thermo-stable Enzymes for DNA Sequencing, *Biotechniques*, 22, 758–765 (1997).
51. Sanger F., Nicklen S., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *P Natl Acad Sci USA*, 74, 5463–5467 (1977).
52. Tully G., Sullivan K., Nixon P., Stones R., Gill P., Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing, *Genomics*, 34, 107–113 (1996).
53. Giestas L., Lima J. C., Baptista P. V., Coupling single base extension to a spectral codification tool for increased throughput screening, *J Biotechnol*, 154, 199–204 (2011).
54. Chen X., Kwok P., Template-directed dye-terminator incorporation (TDI) assay: a homogeneous DNA diagnostic method based on fluorescence resonance energy transfer, *Nucleic Acids Res*, 25, 347–353 (1997).
55. Chen J., Lannone M., A Microsphere-Based Assay for Multiplexed Single Nucleotide Polymorphism Analysis Using Single Base Chain Extension, *Genome Res*, 10, 549–557 (2000).
56. Mengel-Jørgensen J., Sanchez J., Børsting C., Kirpekar F., Morling N., MALDI-TOF mass spectrometric detection of multiplex single base extended primers. A study of 17 y-chromosome single-nucleotide polymorphisms, *Anal Chem*, 76, 6039–6045 (2004).
57. Mengel-Jørgensen J., Sanchez J., Børsting C., Kirpekar F., Morling N., Multiplex Y chromosome SNP genotyping using MALDI-TOF mass spectrometry, *International Congress Series*, 1261, 15–17 (2004).
58. Freeman B., Buchman T., McGrath S., Tabrizi A., Zehnbauser B., Template-directed dye-terminator incorporation with fluorescence polarization detection for analysis of single nucleotide polymorphisms implicated in sepsis, *The Journal of molecular diagnostics*, 4, 209–215 (2002).
59. Fan J., Chen X., Halushka M., *et al.*, Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays, *Genome Res*, 10, 853–860 (2000).
60. Hirschhorn J., Sklar P., Lindblad-Toh K., *et al.*, SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping, *P Natl Acad Sci USA*, 97, 12164–12169 (2000).
61. Syvänen A., From gels to chips: “minisequencing” primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms, *Human Mutat*, 13, 1–10 (1999).
62. Pastinen T., Kurg A., Metspalu A., Peltonen L., Syva A., Minisequencing: A Specific Tool for DNA Analysis and Diagnostics on Oligonucleotide Arrays, *Genome Res*, 7, 606–614 (1997).
63. Forster T., Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Annalen der Physik*, 248, (1939).
64. Sahoo H., Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: Principle and applications. *J Photoch Photobio A*, 12, 20–30 (2011).

65. Lakowicz J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Plenum Publishers, 1999).
66. Clegg R., Fluorescence resonance energy transfer, *Curr Opin Biotech*, 6, 103–110 (1995).
67. Schuler B., Eaton W., Protein folding studied by single-molecule FRET, *Curr Opin Struct Biol*, 18, 16–26 (2008).
68. Sivaramakrishnan S., Spudich J., Systematic control of protein interaction using a modular ER/K α -helix linker, *P Natl Acad Sci USA*, 108, 20467–20472 (2011).
69. Gerecht P., Taylor M., Port J. D., Intracellular localization and interaction of mRNA binding proteins as detected by FRET, *BMC cell biology*, 11, 69-78 (2010).
70. Fessl T., Adamec F., Polívka F., *et al.*, Towards characterization of DNA structure under physiological conditions in vivo at the single-molecule level using single-pair FRET, *Nucleic acids Res* in press (2012).
71. Chatterjee S., Lee J., Valappil N., Luo D., Menon V., Probing Y-shaped DNA structure with time-resolved FRET, *Nanoscale*, 4, 1568–1571 (2012).
72. Loura L., Prieto M., FRET in Membrane Biophysics: An Overview, *Front Physiol*, 2:82 (2011).
73. Solomon M., Guo K., Sudlow G., *et al.*, Detection of enzyme activity in orthotopic murine breast cancer by fluorescence lifetime imaging using a fluorescence resonance energy transfer-based molecular probe. *J Biomed Opt*, 16, 066019(1)–066019(6) (2011).
74. Varlamov O., Detection of SNARE complexes with FRET using the tetracysteine system, *Biotechniques*, 52, 103–118 (2012).
75. Giestas L., Ferreira G., Baptista P. V., Lima J. C., Multiplexed spectral coding for simultaneous detection of DNA hybridization reactions based on FRET, *Sensors and Actuat B*, 134, 146–157 (2008).
76. Giestas L., Petrov V., Baptista P. V., Lima, J. C., General FRET-based coding for application in multiplexing methods, *Photochemical & photobiological sciences*, 8, 1130–1138 (2009).
77. Frank S., Schroeder M., Fernandez P., Taubert S., Amati B., Binding of C-MYC to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation, *Gene Dev*, 15, 2069–2082 (2001).
78. Wasylishen A., Penn L., MYC: the beauty and the beast, *Genes & cancer*, 1, 532–541 (2010).
79. Nesbit C.E., Tersak J.M., Prochownik E.V., MYC oncogenes and human neoplastic disease, *Oncogene* 18, 3004–3016 (1999).
80. Hoffman B., Amanullah A., Shafarenko M., Liebermann D., The proto-oncogene C-MYC in hematopoietic development and leukemogenesis, *Oncogene*, 3414–3421 (2002).
81. Schlagbauer-Wadl H., Griffioen M., Schrier P., *et al.*, Influence of increased C-MYC expression on the growth characteristics of human melanoma, *J Invest Dermatol*, 112, 332–336 (1999).

82. Udtha M., Lee S.-J., Alam R., Coombes K., Huff V., Upregulation of C-MYC in WT1-mutant tumors: assessment of WT1 putative transcriptional targets using cDNA microarray expression profiling of genetically defined Wilms' tumors, *Oncogene*, 22, 3821–3826 (2003).
83. Conde J., de la Fuente J. M., Baptista, P. V., In vitro transcription and translation inhibition via DNA functionalized gold nanoparticles, *Nanotechnology*, 21, 505101 (2010).
84. Rosa J., Conde J., de la Fuente J. M., Lima J. C., Baptista P. V., Gold-nanobeacons for real-time monitoring of RNA synthesis, *Biosens bioelectron*, 36, 161–167 (2012).
85. Peng S., Griffioen M., van Elsas A., *et al.*, FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis, *BMC medicine*, 9, 71–86 (2011).
86. Kopelman P., Health risks associated with overweight and obesity, *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 8 Suppl 1, 13–17 (2007).
87. Frayling T., Timpson N., Weedon M., *et al.*, A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity, *Science*, 316, 889–894 (2007).
88. Sanchez-Pulido L., Andrade-Navarro M., The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily, *BMC biochemistry*, 8, 23–29 (2007).
89. Jia G., Yanga C.-G., Yang S., *et al.*, Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO, *FEBS Lett*, 582, 3313–3319 (2009).
90. Wu Q., Saunders R., Szkudlarek-Mikho M., Serna I., Chin K.-V., The obesity-associated FTO gene is a transcriptional coactivator, *Biochemical and biophysical research communications*, 401, 390–395 (2010).
91. Berulava T., Horsthemke B., The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels, *Eur J Hum Genet*, 18, 1054–1056 (2010).
92. Joseph Sambrook, D. W. R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001).
93. Springer A., *et al.*, A Rapid Method for Manual or Automated Purification of Fluorescently Labeled Nucleic Acids for Sequencing, Genotyping, and Microarrays, *Journal of Biomolecular Technique*, 14, 17–32 (2003).
94. Burgi E., Hershey A., Sedimentation Rate as a Measure of Molecular Weight of DNA, *Biophys J*, 3, 309–321 (1963).
95. SantaLucia J., A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *P Natl Acad Sci USA*, 95, 1460–1465 (1998).
96. Bartlett J., Stirling D., *PCR Protocols*, 226, 92 (Humana Press, 2003).
97. Didenki V., *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes*, 227, (Humana Press, 2006).

98. Mark D., A. & Venture, C. *Automated DNA sequencing and analysis*. (Academic Press: 1994).
99. Kaderali L., Deshpande A., Nolan J., White S., Primer-design for multiplexed genotyping, *Nucleic Acids Res*, 31, 1796–1802 (2003).
100. Gao Y., Wolf L., Georgiadis R., Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: a solution versus surface comparison, *Nucleic acids Res*, 34, 3370–3377 (2006).
101. Canaves J., Morse A., West B., Biocomputing/Bioinformatics PCR primer selection tool optimized for high- throughput proteomics and structural genomics, *Biotechniques*, 36, 1040–1042 (2004).
102. Mayor S., Bilgrami S., Techniques Fretting about FRET in Cell and Structural Biology, *Cell press*, 43–49 (2008).
103. Vol G., The effect of temperature on fluorescence of solutions, *J Phys Chem-US*, 63, 4–7 (1959).

7. Anexos

Anexo A – Plasmídeo utilizado para clonar uma porção do exão 3 de C-MYC, sequência de C-MYC utilizada nos ensaios de hibridação, sequência de produto de PCR do gene FTO que contém o a ser detectado

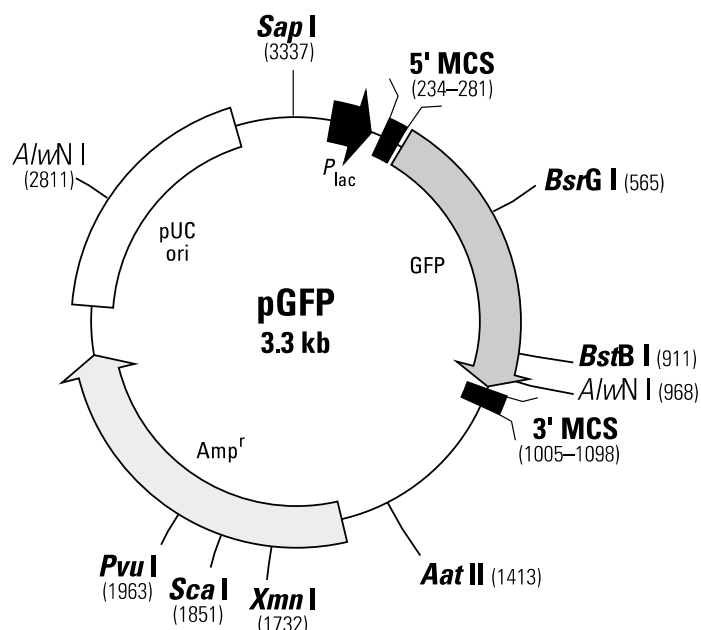


Figura A.1. Plasmídeo pGFP utilizado para clonar sequência de C-MYC

A.2. Sequência de C-MYC clonada no plasmídeo pGFP e utilizada para os ensaios de hibridação (229 bp)

gctcatttctgaagaggactgttgcggaaacgacgagaacagttgaaacacaaactgaacagctacggaactcttgctgtaagga
aaagtaaggaaaacgattccttctaacagaaatgtcctgagcaatcacctatgaactgtttcaaatgcatgatcaaatgcaacctcaca
ccttggtctgagctctgagactgaaagatttagccataatgtaaactgcct

Sequência representada de 5' para 3'

A.3. Sequência de produto de PCR de gene FTO que contém o SNP de interesse (443 bp)

gcaaaatggcaacacacactctgtatcttttggcagatcagaacataatgaaaataaaaaaattcaaaactggctcttgaatgaa
ataggattcagaagagatgatctcaaatctactttatgagataatgtcctttttaaataaaacactaacatcagttatgcattagaatgtct
gaattattattctaggttccttgcgactgctgtgaattt^wgtgatgcacttggatagctctgttactctaaagttaataggtaacagtcag
aaatggagtgggagagcataaaagcaaactgaaatgcaaatagctggtaccctgaagccattaactttaagctggttattcctgacctac
tgtttggacataagatggtagagaggctgagtgtgacttgaacattgttccttagaacaacaccatccttgggctg

O SNP a detectar encontra-se demarcado a amarelo.

w- A ou T

Sequencia representada de 5' para 3'

Anexo B - Fluorogramas de Sequenciação

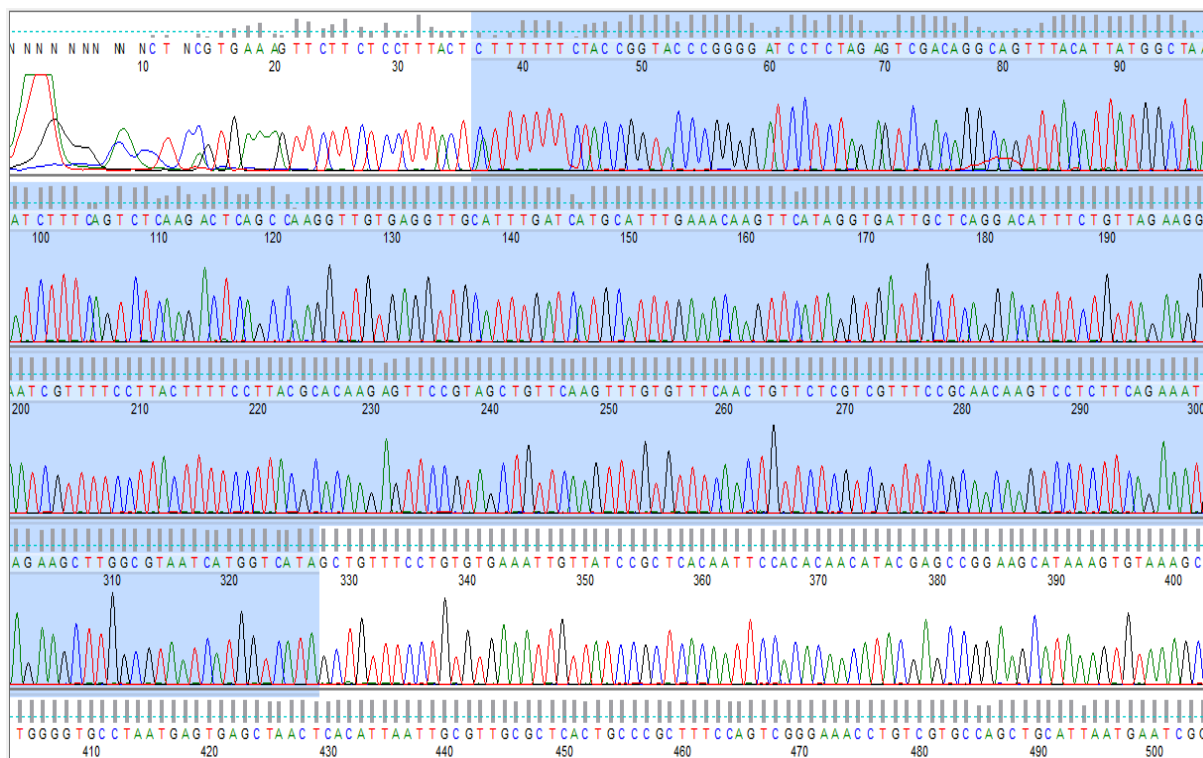


Figura B.1. Fluorógrama de sequenciação da porção de C-MYC clonada em pGFP (*primer Forward*). A região a azul corresponde à porção de C-MYC; a região a branco corresponde ao plasmídeo.



Figura B.2. Fluorograma de sequenciação de amostra 1 (*primer Forward*)
A região demarcada a amarelo contém a base a ser questionada.

Anexo B - Fluorogramas de Sequenciação (continuação)

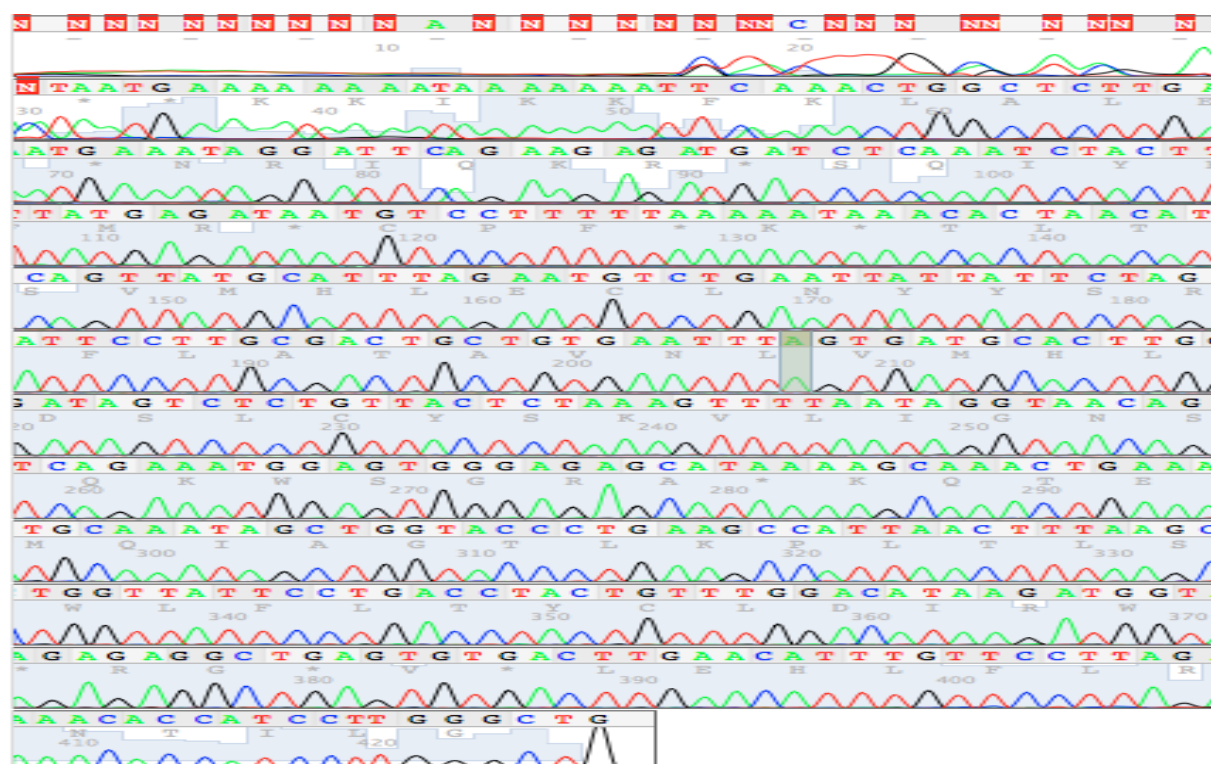


Figura B.3. Fluorógrama de sequenciação de amostra 2 (*primer Forward*)

A região demarcada a amarelo contém a base a ser questionada

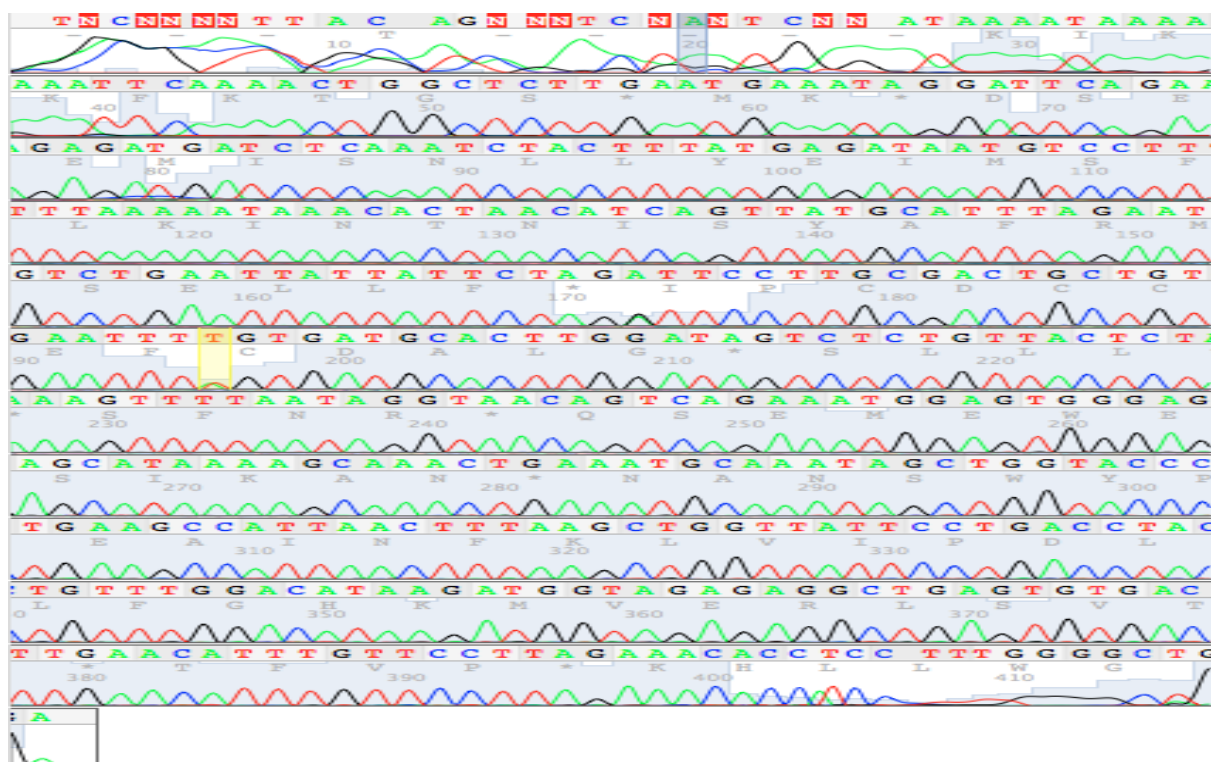


Figura B.4. Fluorógrama de sequenciação de amostra 3 (*primer Forward*)

A região demarcada a amarelo contém a base a ser questionada

Anexo B - Fluorogramas de Sequenciação (continuação)



Figura B.5. Fluorógrama de sequenciação de amostra 4 (*primer Forward*)

A região demarcada a amarelo contém a base a ser questionada

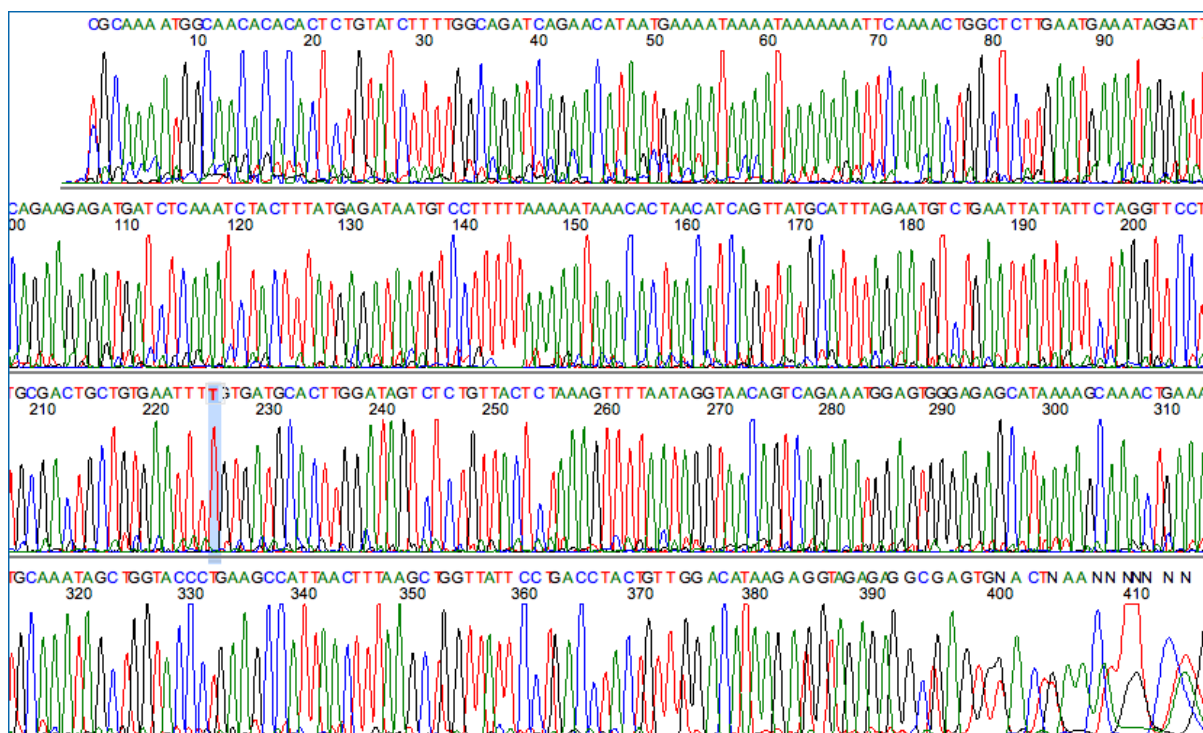


Figura B.6. Fluorógrama de sequenciação de amostra 5 (*primer Forward*)

A região demarcada a azul contém a base a ser questionada

Anexo B - Fluorogramas de Sequenciação (continuação)

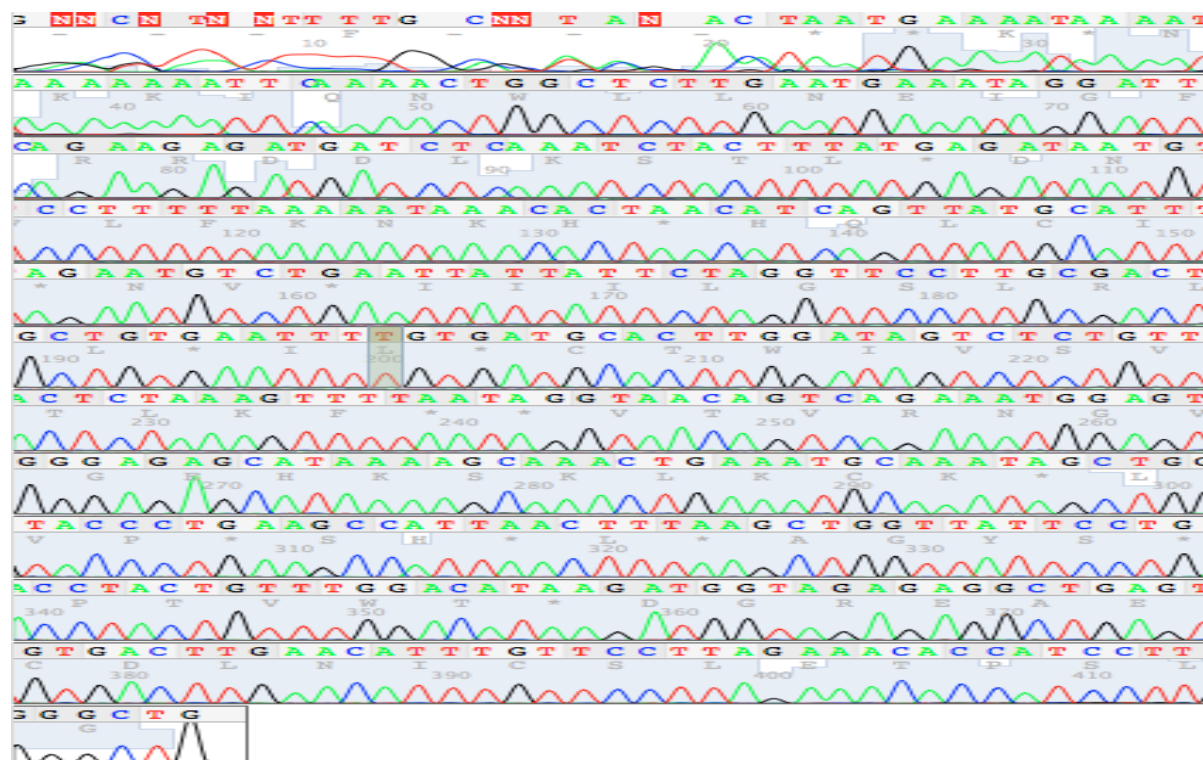


Figura B.7. Fluorógrama de sequenciação de amostra 6 (*primer Forward*)
A região demarcada a amarelo contém a base a ser questionada.

Anexo C – Produtos de PCR utilizados como *templates* nas reacções de SBE

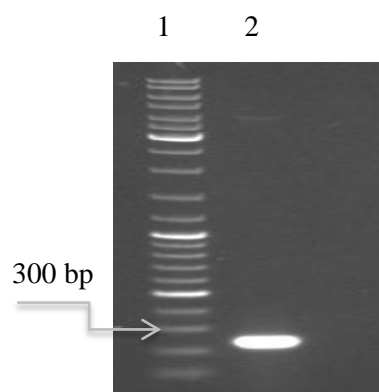


Figura C.1. Electroforese em gel de agarose de produto de PCR de C-MYC após precipitação
Electroforese realizada a 40 V durante 120 minutos, 0,8 % de agarose em 1×TAE
1) GeneRuler™ DNA Ladder Mix, *ready-to-use* ; 2) produto de PCR de C-MYC (229 bp)

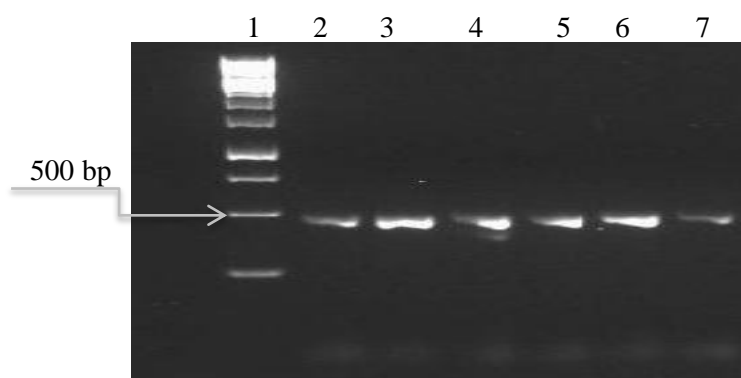


Figura C.2. Electroforese em gel de agarose de produto de PCR de FTO
Electroforese realizada a 100 V durante 55 minutos, 1,2 % de agarose em 1×TAE
1) Gene ruler 1kb – Fermentas ; 2) Amostra 2 ; 3) Amostra 1 ; 4) Amostra 5 ; 5) Amostra 3 ; 6) Amostra 4 7) amostra 6

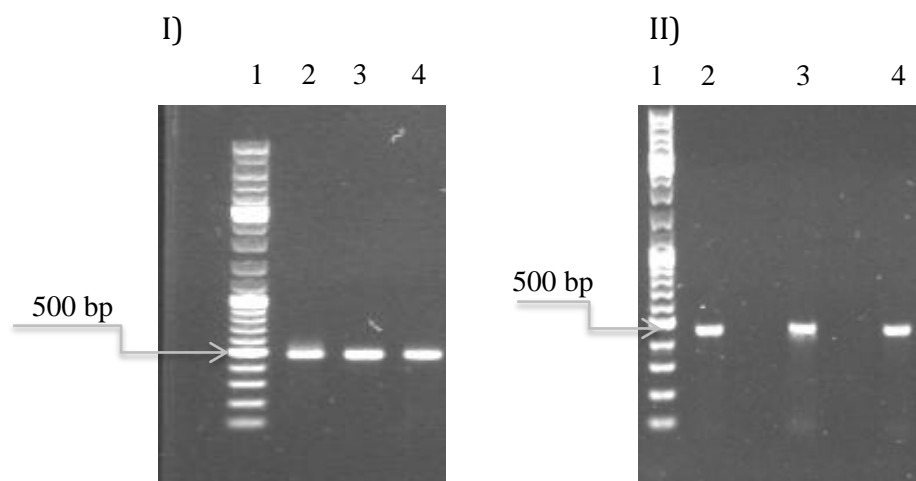


Figura C.3. Electroforese em gel de agarose de produto de PCR de FTO após extracção do gel de agarose

I) Electroforese realizada a 70 V durante 60 minutos, a 0,8 % de agarose em 1×TAE

1) GeneRuler™ DNA Ladder Mix, *ready-to-use* ; 2) Amostra 2 ; 3) Amostra 3 ; 4) Amostra 1

II) Electroforese realizada a 100V durante 60 minutos, a 0,8% de agarose em 1×TAE

1) GeneRuler™ DNA Ladder Mix, *ready-to-use* ; 2) Amostra 6 ; 3) Amostra 5 ; 4) Amostra 4

Anexo D – Espectros de emissão das reacções de SBE

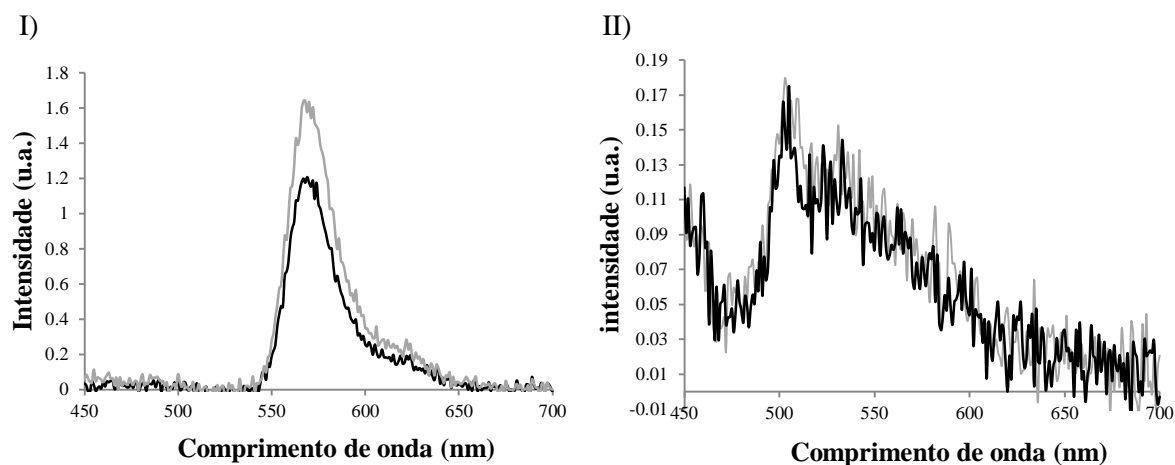


Figura D.1. Espectros de emissão das reacção de SBE, e reacção controlo, com *template* TLA na presença de ddU

I) Espectros de emissão após remoção de banda de emissão do doador; II) Espectros de emissão após precipitação; A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima).. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

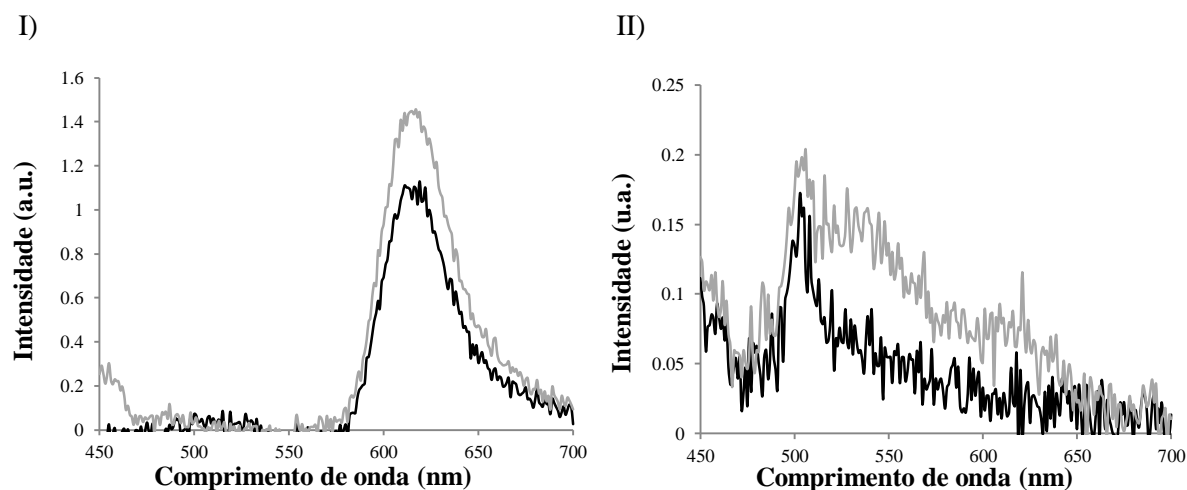


Figura D.2. Espectros de emissão das reacção de SBE, e reacção controlo, com *template* TLG na presença de ddC

I) Espectros de emissão após remoção de banda de emissão do doador; II) Espectros de emissão após precipitação. A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima).. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

Anexo D – Espectros de Emissão das reacções de SBE - (continuação)

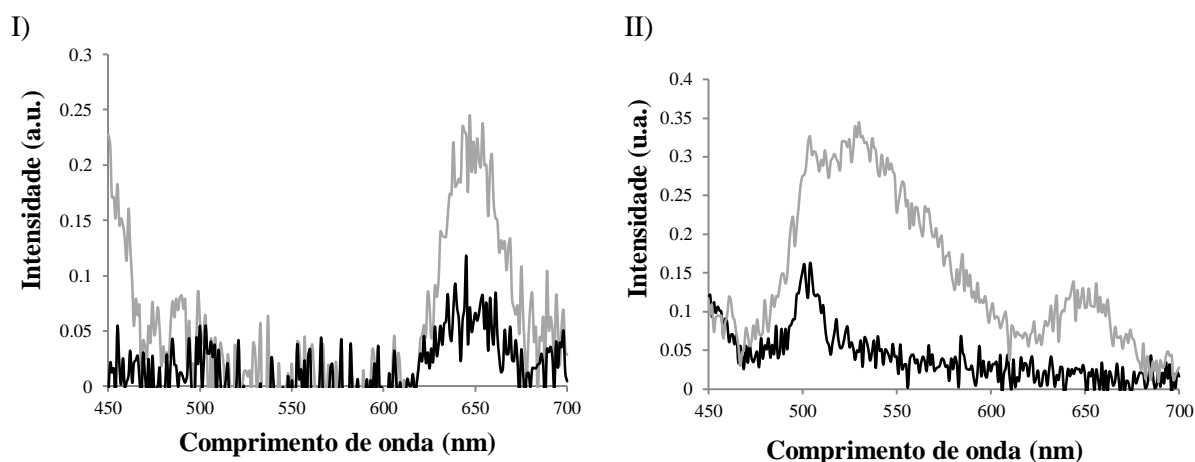


Figura D.3. Espectros de emissão das reacção de SBE, e reacção controlo, com *template* TLC na presença de ddG

I) Espectros de emissão após remoção de banda de emissão do doador; II) Espectros de emissão após precipitação. A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Espectros de emissão traçados utilizando condição 2, descrita na Tabela 3.8.

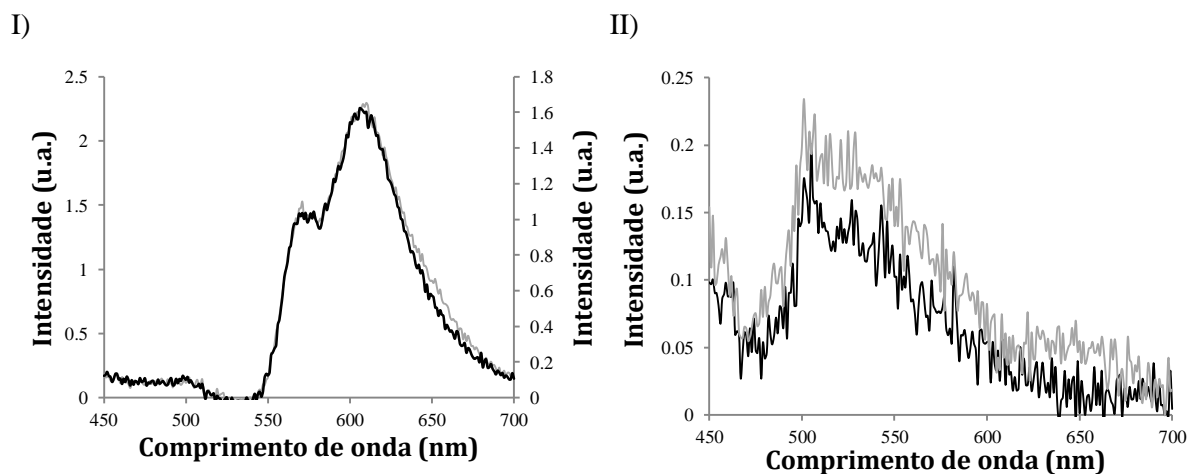


Figura D.4. Espectros de emissão das reacção de SBE, e reacção controlo, com *template* TLC na presença de 4 ddNTPs

I) Espectros de emissão após remoção de banda de emissão do doador; II) Espectros de emissão após precipitação. A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima).. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 2, descrita na Tabela 3.8.

Anexo D – Espectros de Emissão das reacções de SBE - (continuação)

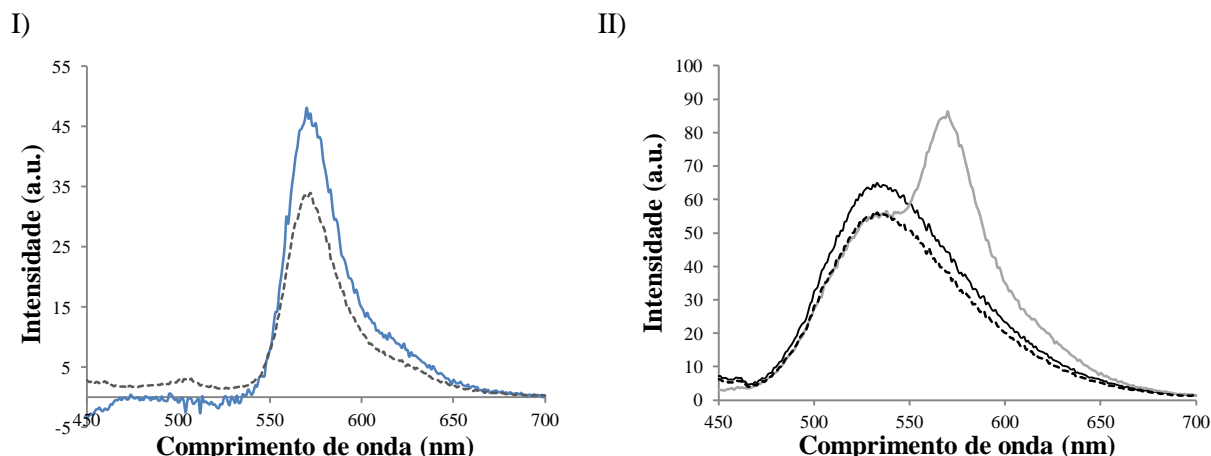


Figura D.5. Espectros de emissão da reacção de SBE, e respectivo controlo, utilizando o *primer* universal com *template* Univ-TLA e na presença de ddU

I) Espectro de emissão de ddU antes e após a adição de D₁; II) Cálculo de transferência de energia.

A linha a preto representa a banda de emissão do doador na ausência de aceitantes; a linha contínua a cinzento representa reacção de SBE; a linha tracejada a preto representa o ajuste da banda de emissão doador na ausência de aceitantes à banda do doador na reacção de SBE; a linha tracejada a cinzento representa a banda de emissão de ddU antes da adição de D₁; a linha a azul representa a banda de emissão de ddU após a adição do doador, com a banda do doador removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

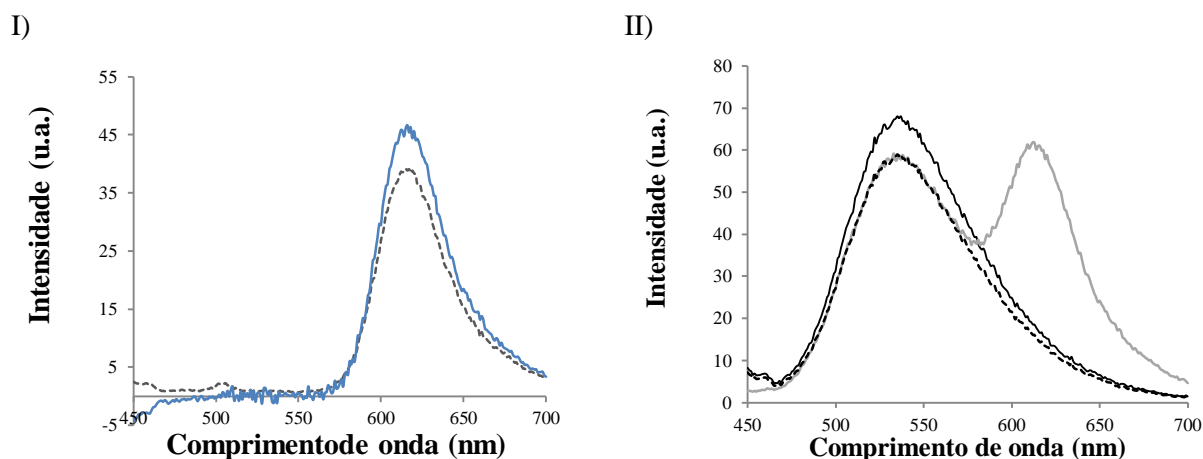


Figura D.6. Espectros de emissão da reacção de SBE, e respectivo controlo, utilizando o *primer* universal com *template* Univ-TLG na presença de ddC

I) Espectro de emissão de ddC antes e após a adição de D₁; II) Cálculo de transferência de energia.

A linha a preto representa a banda de emissão do doador na ausência de aceitantes; a linha contínua a cinzento representa reacção de SBE; a linha tracejada a preto representa o ajuste da banda de emissão doador na ausência de aceitantes à banda do doador na reacção de SBE; a linha tracejada a cinzento representa a banda de emissão de ddC antes da adição de D₁; a linha a azul representa a banda de emissão de ddC após a adição do doador, com a banda do doador removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

Anexo D – Espectros de Emissão das reacções de SBE - (continuação)

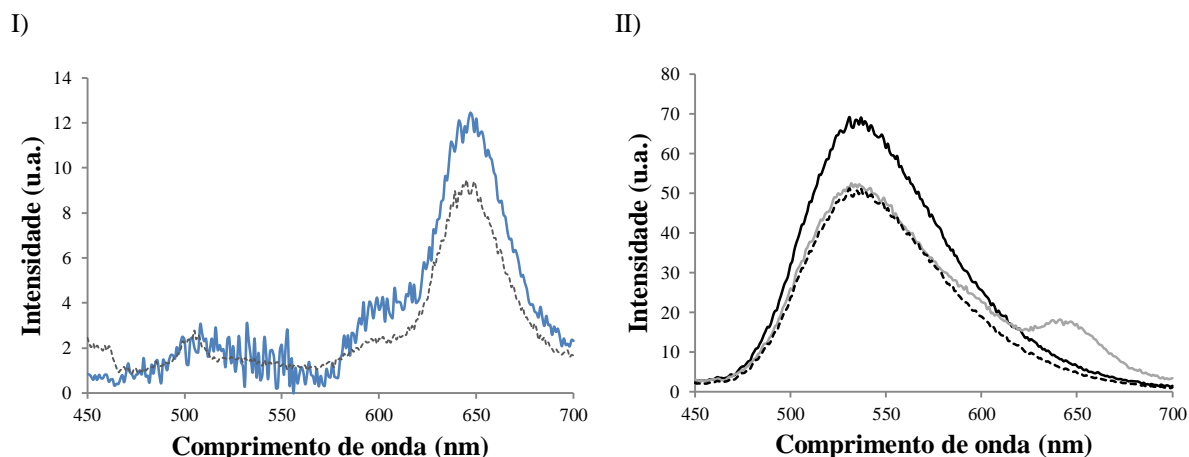


Figura D.7. Espectros de emissão da reacção de SBE, e respectivo controlo, utilizando o *primer* universal com *template* Univ-TLC e na presença de ddG

I) Espectro de emissão de ddG antes e após a adição de D₁; II) Cálculo de transferência de energia.

A linha a preto representa a banda de emissão do doador na ausência de aceitantes; a linha contínua a cinzento representa reacção de SBE; a linha tracejada a preto representa o ajuste da banda de emissão doador na ausência de aceitantes à banda do doador na reacção de SBE; a linha tracejada a cinzento representa a banda de emissão de ddG antes da adição de D₁; a linha a azul representa a banda de emissão de ddG após a adição do doador, com a banda do doador removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

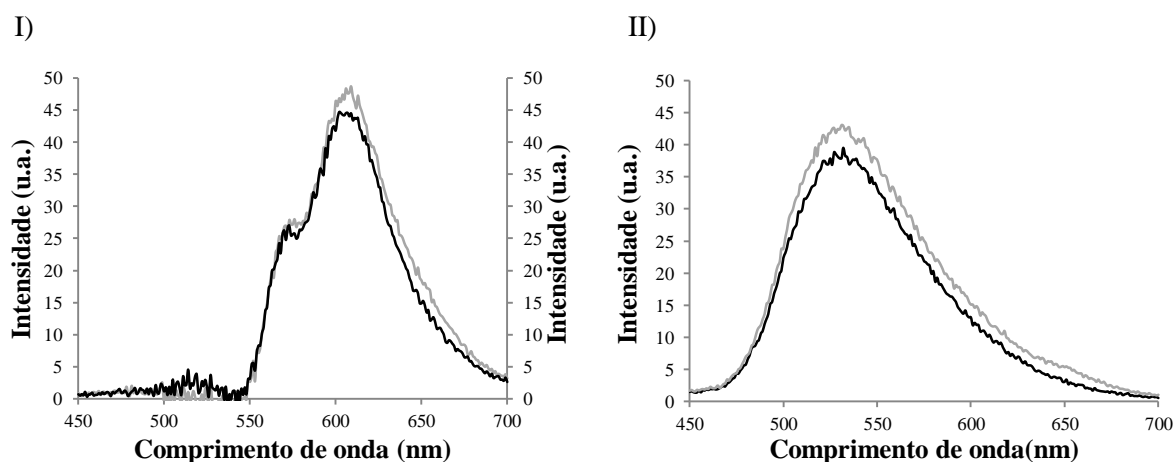


Figura D.8. Espectros de emissão da reacção de SBE, e respectivo controlo, utilizando o *primer* universal com *template* Univ-TLC na presença de 4 ddNTPs

I) Espectros de emissão após remoção de banda de emissão do doador; II) Espectro de emissão após precipitação; A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Espectros de emissão traçados utilizando a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

Anexo D – Espectros de Emissão das reacções de SBE - (continuação)

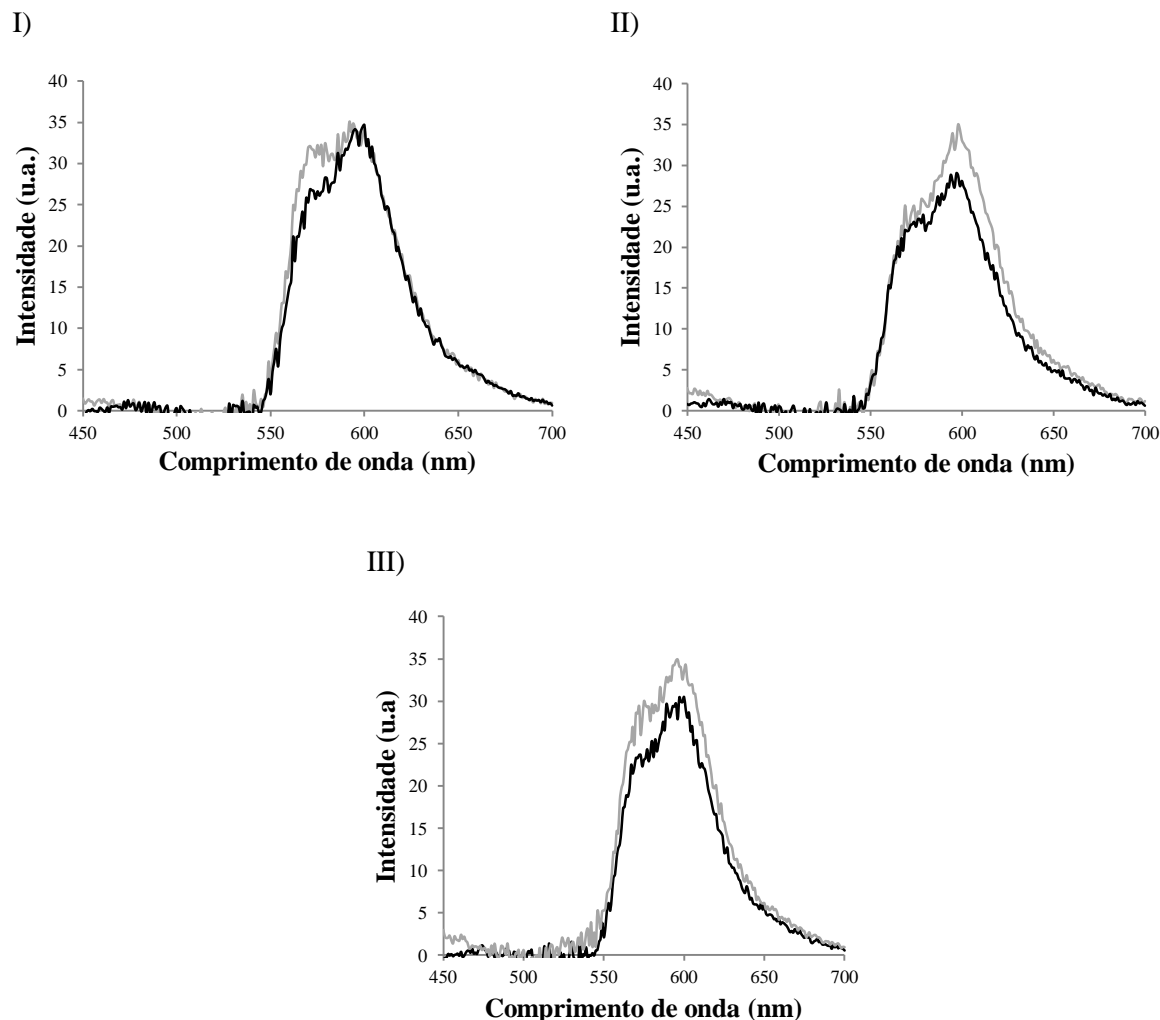


Figura D.9. Espectros de emissão da reacção de SBE e reacção controlo, utilizando o *primer* universal na presença de diferentes *templates* e ddA e ddU

I) Reacções na amostra 1 que apresenta um genótipo homozigótico T/T; II) Reacções na amostra 2 que apresenta um genótipo homozigótico A/A; III) Reacções na amostra 3 que apresenta um genótipo heterozigótico A/T; A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Nestes espectros, a banda de emissão do doador foi removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

Anexo D – Espectros de Emissão das reacções de SBE - (continuação)

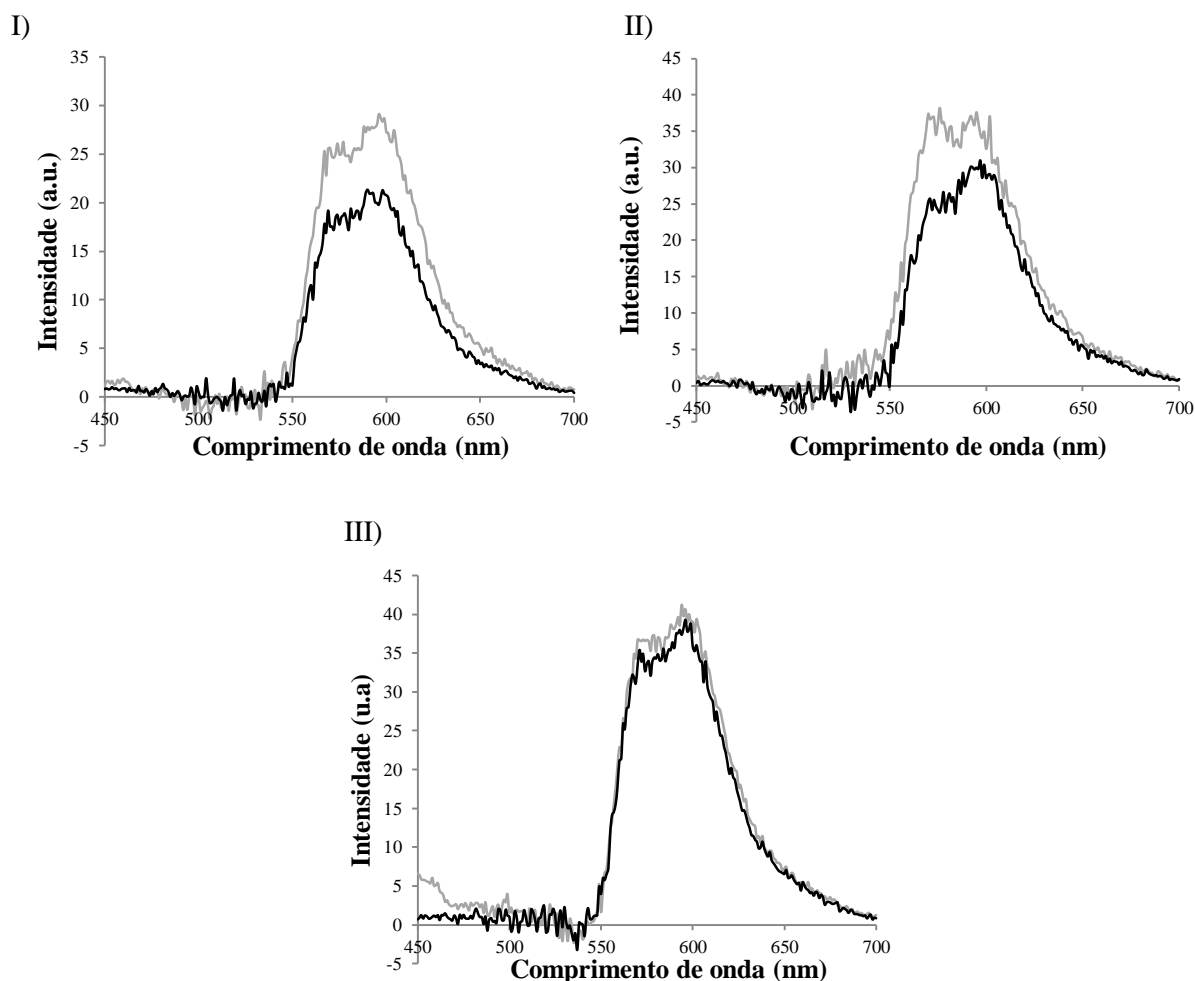


Figura D.10. Espectros de emissão da reacção de SBE e reacção controlo, utilizando o *primer* universal na presença de diferentes *templates*, ddA e ddU

I) Reacções na amostra 4 que apresenta um genótipo heterozigótico A/T; II) Reacções na amostra 5 que apresenta um genótipo homozigótico T/T; III) Reacções na amostra 6 que apresenta um genótipo homozigótico T/T; A linha a cinzento representa reacção de SBE (com enzima); a linha a preto representa reacção controlo (sem enzima). Nestes espectros, a banda de emissão do doador foi removida. Espectros de emissão traçados utilizando a condição 3, descrita na Tabela 3.8.

